

Untersuchungen zur Struktur
des *FAS1* Gens
der Hefe

von

Hans-Joachim Höltke

aus Fürth/Bayern

Diss
Erlangen
1984

Untersuchungen zur Struktur des *FAS1* Gens der Hefe

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades**

**vorgelegt von
Hans-Joachim Höltke
aus Fürth/Bayern**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:	30.11.1984
Vorsitzender der Promotionskommission:	Professor Dr. K. Brodersen
Erstberichterstatter:	Professor Dr. E. Schweizer
Zweitberichterstatter:	Professor Dr. B. Fleckenstein

Diese Arbeit wurde selbstständig durchgeführt. Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht benutzt.

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1981 bis Oktober 1984 unter Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer am Lehrstuhl für Biochemie des Instituts für Mikrobiologie und Biochemie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. E. Schweizer möchte ich für die Unterstützung, die er mir und meiner Arbeit jederzeit zu Teil werden ließ herzlich danken.

Besonderen Dank schulde ich dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Dr. M. Schweizer, der am Zustandekommen der geschilderten Ergebnisse einen entscheidenden Anteil hatte, für die lehrreiche und kollegiale Zusammenarbeit. Ebenso danke ich ihm für die Überlassung unveröffentlichter Ergebnisse.

Dr. L. Roberts danke ich für die Überlassung unveröffentlichter Ergebnisse und die stets gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Den anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, C. Lebert, K. Takabayashi, G. Müller und H. Köttig danke ich für ihre Unterstützung und Kollegialität wie auch für die Überlassung unveröffentlichter Ergebnisse.

Dr. H. Burkhard und P. Franke danke ich für die Durchführung elektronenmikroskopischer Untersuchungen.

Außerdem möchte ich mich bei einer Reihe von Studentinnen und Studenten bedanken, die im Rahmen ihres Praktikums an dieser Arbeit beteiligt waren.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0036

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Inhaltsverzeichnis	3
Verzeichnis der Tabellen	4
Verzeichnis der Figuren	5
I. EINLEITUNG	7
II. MATERIAL und METHODEN	10
1. Geräte	10
2. Plasmid-Vektoren	11
3. Enzyme	11
4. Chemikalien	12
5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	13
6. <i>E. coli</i> Stämme	13
7. Medien	14
8. Proteinbestimmungen	15
9. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen	15
10. Anzucht von <i>E. coli</i> und Hefe Zellen	15
11. Plasmid-DNA Isolierung	15
12. Plasmid-DNA Präparation für analytische Zwecke (‘mini-screen’ Methode)	16
13. CsCl/Ethidium Bromid Dichtegradienten Zentrifugation von Plasmid-DNA	17
14. Restriktionsendonuklease-Spaltungen	20
15. Agarose-Gel Elektrophorese von DNA	20
16. Polyacrylamid-Gel Elektrophorese von DNA	20
17. Polyacrylamid-Gel Elektrophorese von Proteinen	21
18. Isolierung von DNA-Fragmenten	21
19. Ligation von DNA	22
20. Transformation von <i>E. coli</i>	23
21. Radioaktive Markierung von DNA durch ‘nick translation’	24
22. Transfer von DNA auf Nitrocellulose- bzw. Nylon-Membranen (Southern Transfer)	25
23. Isolierung von poly(A) RNA aus Hefe	26
24. Denaturierende Elektrophorese von RNA	26
25. Transfer von RNA auf Nitrocellulose-Membranen (‘Northern’ Transfer)	26
26. Hybridisierungen mit radioaktiv markierter DNA	26
27. Anreicherung von FAS mRNA durch Gelelution	27
28. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
29. Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe	29
30. Kolonie-Hybridisierung	30
31. Klonierung in M13 Vektoren	30
32. Isolierung von einzelsträngiger Phagen DNA (M13-System)	31
33. Isolierung von doppelsträngiger Phagen DNA (replikative Form)	31
34. DNA-Sequenzierung nach der Dideoxynucleotid Terminations-Methode	32
35. Ultraschall-Lyse von <i>E. coli</i> Zellen	33
36. Transfer von Proteinen aus Acrylamid-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (‘Western-Transfer’)	33
37. Entfernung von <i>E. coli</i> spezifischen Antikörpern aus Kaninchen- bzw. Schaf-Antisera	34
38. Markierung von Proteinen mit ¹²⁵ I	34

III. ERGEBNISSE	36
1. Immunologische Untersuchungen von Extrakten <i>FAS</i> DNA-haltiger <i>E. coli</i> Klone	36
2. Untersuchung der chromosomalen Kontinuität der ursprünglichen, aus einer Cosmid-Genbank isolierten <i>FAS1</i> Klone	40
3. Restriktionskartierung der <i>FAS1</i> Region	44
4. Die Transkriptionsregion der <i>FAS</i> Gene	56
4.1 Kartierung der Transkriptionsregion von <i>FAS1</i>	56
4.2 Untersuchung der poly(A) RNA aus Spleiß-defekten Hefemutanten	58
4.3 Elektronenmikroskopie von <i>FAS1</i> mRNA - DNA Hybriden	58
4.4 Kartierung der Transkriptionsregion von <i>FAS2</i>	61
5. Subklonierung von <i>FAS1</i> Restriktionsfragmenten	63
5.1 Physikalische Charakterisierung von <i>FAS1</i> -Teilbereichen und Bestimmung ihrer Orientierung in den Vektoren pMS 201, pBR 322 und pBR 325	63
5.2 Klonierung von <i>FAS1</i> Fragmenten in die Centromerhaltigen Vektoren pBC 351 und pCEN 11-3-1	70
5.3 Einbau einer <i>Sma</i> I-Schnittstelle in pMS 3021 und Charakterisierung von daraus hergestellten <i>Bal</i> 31 Deletionsplasmiden	73
5.4 Klonierung von Restriktionsfragmenten in M13 Vektoren	78
5.5 Konstruktion von verkürzten M13 Klonen mit <i>Bal</i> 31 Deletionen	84
6. Molekulare Charakterisierung von <i>FAS</i> Transformanten-DNA	88
7. DNA-Sequenzierung des <i>FAS1</i> Gens	95
IV. DISKUSSION	116
V. ZUSAMMENFASSUNG	126
VI. LITERATUR	127
Abkürzungen	131

VERZEICHNIS DER TABELLEN

1. Länge der in dieser Arbeit verwendeten Standard-DNA Fragmente	52
2. Positionen der Restriktionsschnittstellen im <i>FAS1</i> Plasmid pMS 3021	53
3. Größe der Restriktionsfragmente von Plasmid pMS 3021	54
4. Subklonierte Restriktionsfragmente aus dem Bereich des <i>FAS1</i> Gens	68
5. Codon-Häufigkeiten im <i>FAS1</i> Gen	115

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

1a Reaktionen der Fettsäuresynthese	7
1b Molekulare Struktur des $\alpha\beta$ Protomeren im $\alpha\beta$ FAS-Komplex der Hefe	8
2. Reinigung einer Plasmid-DNA Präparation durch Sepharose 4B Chromatographie	18
3. CsCl-Ethidium Bromid Dichtegradientenzentrifugation von Plasmid-DNA	19
4. Trennung von markiertem Protein und uneingebautem Jodid-125 über eine Sephadex 8-25 Säule	35
5. Immunologische Untersuchung einiger FAS DNA-haltiger <i>E. coli</i> Klone	38
6. Vergleichende Southern-Hybridisierung und Restriktionskartierung der ersten, in diesem Institut isolierten FAS1 Cosmid-Klone	42
7. Untersuchung der genomischen Kontinuität einiger klonierter FAS1 Plasmide	43
8. Verschiedene Einfach- oder Mehrfach-Restriktionsspaltungen von pMS 3021	45
9. Restriktionsanalyse und Southern-Hybridisierung von pMS 3021 und verschiedener daraus abgeleiteter Subklone zur Kartierung der HincII Schnittstellen	46
10. Restriktionsanalyse einiger FAS1 Subklone zur Bestimmung der BglII Schnittstellen	47
11. Restriktionsanalyse einiger FAS1 Subklone zur Bestimmung von PvuII und HincII Schnittstellen	48
12. Restriktionsanalyse des FAS1 Subklons pMS 3014	49
13. Restriktionskartierung der ClaI Schnittstellen in FAS1 DNA	50
14. Restriktionsspaltungen zur Feinkartierung von pMS 3014	51
15. Restriktionskarte des FAS1 Plasmids pMS 3021	55
16. Northern-Hybridisierung von poly(A) RNA aus Hefe mit verschiedenen Restriktionsfragmenten der FAS1 Region	57
17. Analyse der FAS1 und Actin-Gen Transkripte in <i>rna1</i> und <i>rna2</i> Hefe-Mutanten	59
18. Elektronenmikroskopie von FAS1 mRNA - DNA Hybriden	60
19. Northern-Hybridisierung von poly(A) RNA aus Hefe mit verschiedenen Restriktionsfragmenten der FAS2 Region	62
20. Restriktionsspaltungen verschiedener FAS1 Subklone	64
21. Restriktionsspaltung und Southern-Hybridisierung einiger FAS1 Subklone	65
22. Restriktionsverdauungen zur Feststellung der Orientierung inserierter FAS DNA im Vektor	66
23. Subklonierte FAS1 Fragmente und ihre Orientierung im Vektor	67
24. Restriktionsmuster verschiedener FAS1 Subklone in den Centromer-haltigen Vektoren pBC 351 und pCEN 11-3-1	71
25. Neu konstruierte FAS1 Subklone in pMS 201, pBC 351 und pCEN 11-3-1	72
26. Struktur und Funktion eines B α HI/S α aI-Adaptors	74
27. Partielle B α HI und EcoRI Spaltung von pMS 3021	75
28. Restriktionsanalyse von Plasmiden mit eingebautem B α HI/S α aI Adaptor	76
29. BaI31 Deletionsplasmide	77
30. Die Insertionsregion verschiedener M13 Vektoren	79
31. Restriktionsanalyse von doppelsträngiger M13 DNA mit subklonierten FAS1 Fragmenten aus pMS 3021	80
32. Elektrophoretische Auftrennung von einzelsträngiger intakter M13 DNA mit und ohne FAS1-DNA Insertionen	81
33. Identifizierung von M13 Phagen mit eingebauter FAS1-DNA durch Dot-Hybridisierung	82

34. Orientierung der in Abb.31 charakterisierten <i>FAS1</i> Fragmente in den M13 Vektoren mp8 und mp11	83
35. Kinetik der <i>Bal31</i> Nuklease-Aktivität	85
36. Elektrophoretische Analyse von einzelsträngiger DNA rekombinanter M13 Phagen mit eingebauten <i>FAS1</i> Fragmenten	86
37. Untersuchung von einzelsträngiger Phagen-DNA durch Hybridisierung und <i>S1</i> Nuklease-Behandlung	87
38. Southern-Analyse von Hefe-DNA aus <i>FAS2</i> -Transformanten	91
39. Restriktions- und Southern-Analyse von <i>FAS1</i> Transformanten-DNA's	92
40. Charakterisierung verschiedener <i>FAS1</i> Hefe-Transformanten durch Southern-Hybridisierungen	93
41. Restriktions- und Southern-Analyse von 'Rescue' Plasmiden nach Transformation von <i>fas1</i> -3267 mit pMS 3027	94
42. Strategie zur DNA-Sequenzbestimmung des <i>FAS1</i> Gens	98
43. Leserahmen in der bisher ermittelten <i>FAS1</i> DNA-Sequenz	99
44. DNA-Sequenz des <i>FAS1</i> Teilbereichs A	100
45. DNA-Sequenz des <i>FAS1</i> Teilbereichs B	101
46. DNA-Sequenz des <i>FAS1</i> Teilbereichs C	102
47. DNA-Sequenz des <i>FAS1</i> Teilbereichs D	104
48. DNA-Sequenz des <i>FAS1</i> Teilbereichs E	109
49. DNA-Sequenz des <i>FAS1</i> Teilbereichs F	110
50. Sequenziergel mit der Sequenz des aktiven Zentrums der Acetyl-Transferase	111
51. Sequenziergel mit der Sequenz des aktiven Zentrums der Malonyl/Palmityl-Transferase	112
52. Hydrophilieprofil der aus Abb.46 für den Bereich C ermittelten Proteinsequenz	113
53. Hydrophilieprofil der aus Abb.47 für den Bereich D ermittelten Proteinsequenz	114
54. Lage der verschiedenen funktionellen Domänen im <i>FAS1</i> Gen	121
55. Restriktionskarte der Klone YEpFAS1 (Herkunft S. Wakil) und 33F1 (Herkunft J. Carbon)	122
56. Restriktionskarte der Klone YEpFAS2 (Herkunft S. Wakil) und 102B5 (Herkunft J. Carbon)	123
57. Funktionelles Modell der Huhn-Fettsäuresynthetase	124
58. Funktionelles Modell der Hefe-Fettsäuresynthetase	125

1. EINLEITUNG

Die Synthese von langkettigen, gesättigten Fettsäuren erfolgt bei allen bisher untersuchten Organismen prinzipiell nach dem gleichen Schema (1, 2): ausgehend von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA werden in einem zyklischen Prozeß durch Verlängerung um jeweils zwei Kohlenstoff-Atome Fettsäuren mit 16 - 18 C-Resten synthetisiert (Abb.1a).

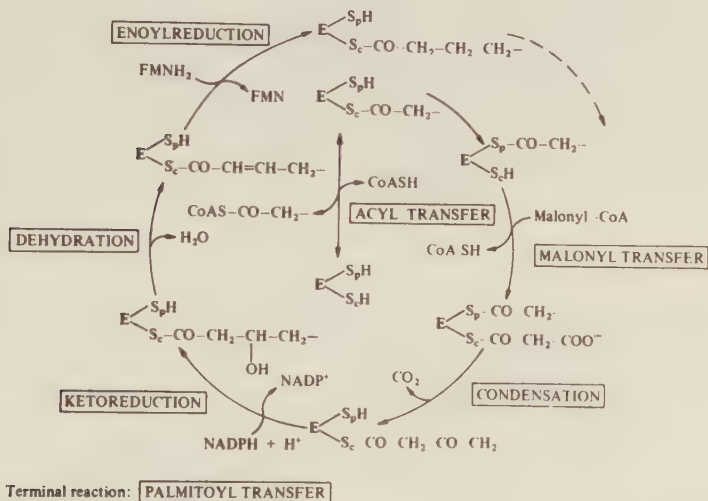


Abb.1a : Reaktionsschema der Fettsäurebiosynthese, nach Lynen (102).
E- S_c : aktive Stelle des Acyl Carrier Proteins,
E- S_p : aktive Stelle der beta-Ketoacylsynthetase.

Obwohl das Reaktionsschema im wesentlichen bei den unterschiedlichsten Organismen ähnlich ist, unterscheiden sich die Strukturen der für die Fettsäuresynthese verantwortlichen Enzyme bei Vertretern der verschiedenen Gruppen von Lebewesen stark voneinander. In Prokaryoten (3) und in den Chloroplasten von Pflanzen (4) liegen die verschiedenen an der Fettsäuresynthese beteiligten Enzyme alle einzeln vor. Bei Pilzen (5) wurde gefunden, daß die Fettsäuresynthetase ein Proteinkomplex aus zwei verschiedenen Untereinheiten mit der Struktur $\alpha_2\beta_2$ ist. Jede Untereinheit hat mehrere Einzelenzymaktivitäten in einem Protein verschmolzen (Abb.1b). Durch genetische Studien konnte an der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden, daß die Acetyl-Transferase, Malonyl-Transferase, Palmityl-Transferase, Dehydratase und Enolreduktase (2.Reduktion) Teilaktivitäten auf der beta-Untereinheit (codiert vom Gen *FAS1*) liegen und daß die beta-Ketoacylsynthetase (Kondensation), die beta-Ketoacylreduktase (1.Reduktion) Teilaktivitäten sowie das Acyl-Carrierprotein auf der alpha-Untereinheit (codiert vom Gen *FAS2*) vereinigt sind (6).

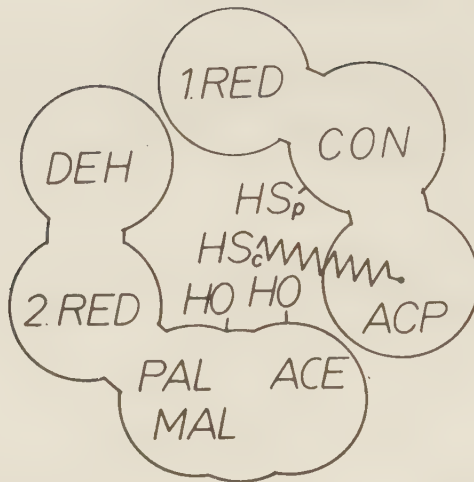


Abb.1b: Molekulare Struktur des $\alpha\beta$ Protomerens im $\alpha_2\beta_2$

FAS-Komplex der Hefe. Die Reihenfolge der Domänen ist willkürlich gewählt.

1. RED: beta-Ketoacylreduktase,

CON: beta-Ketoacylsynthetase,

ACP: Acyl Carrier Protein, DEH: Dehydratase,

2. RED: Enoylreduktase, PAL: Palmityl-Transferase,

MAL: Malonyl-Transferase, ACE: Acetyl-Transferase.

Bei höheren Tieren (Wirbeltieren) schließlich besteht die Fettsäuresynthetase aus zwei identischen Untereinheiten (α_2), welche alle für die Fettsäuresynthese nötigen Enzymaktivitäten in einer einzigen multifunktionellen Proteinkette vereinigt enthalten (7).

Nach der in den vergangenen Jahren gelungenen Klonierung von *FAS1* und *FAS2* DNA aus *S. cerevisiae* (8) sollten im Rahmen dieser Arbeit durch Anwendung molekularbiologischer und genetischer Techniken weitere Kenntnisse über Struktur und Funktion der beiden multifunktionellen *FAS* Gene in Hefe gewonnen werden:

Zunächst sollte durch Restriktionskartierung eine physikalische Charakterisierung der klonierten *FAS* DNA vorgenommen werden. Auf dieser basierend sollten dann durch Hybridisierung geeigneter DNA-Abschnitte die in *FAS1* bzw. *FAS2* mRNA transkribierten DNA-Bereiche definiert werden. Weiterhin sollte eine Serie von *FAS1* und *FAS2* Subklonen hergestellt und mit diesen geeignete *fas* Hefemutanten transformiert werden. Dabei waren Hinweise auf die Reihenfolge und Lage der verschiedenen funktionellen Domänen in den beiden *FAS* Genen zu erwarten. Durch Elektronenmikroskopie, DNA-Sequenzierung und Northern-Hybridisierungsstudien sollte geprüft werden, ob und gegebenenfalls wo in den *FAS* Genen Introns enthalten sind.

Die Ermittlung der DNA-Sequenz der *FAS* Gene von *S. cerevisiae* sollte schließlich Voraussetzung dafür sein, daß Vergleiche mit den Sequenzen der *FAS* Gene anderer Organismen verschiedener Entwicklungsstufen und mit unterschiedlich strukturierten Fettsäuresynthetasen angestellt werden können. Aus diesen vergleichenden Studien könnten Einblicke in die Evolution multifunktionaler Proteine erhalten werden. Es ist nicht bekannt, ob und wie die verschiedenen oben genannten Strukturvarianten des *FAS*-Systems in der Natur sich aus einer ursprünglich gemeinsamen Organisationsform heraus entwickelt haben und welche Strukturmerkmale des Multienzymsystems für den Reaktionsablauf essentiell und daher in allen *FAS*-Komplexen erhalten geblieben sind.

Außerdem sollten mit den geplanten Untersuchungen Promotor- und andere Kontroll-Sequenzen der beiden *FAS*-Gene ermittelt und dadurch Aufschluß über die Regulation der *FAS*-Synthese auf Transkriptionsebene erhalten werden. Insbesondere könnte in diesem Zusammenhang auch die vorläufig noch offenen Frage der koordinierten Expression der beiden *FAS* Gene in Hefe geklärt werden.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Geräte

Computer: Hardware (Apple //e mit 80 Zeichen Karte, 2 Diskettenlaufwerken, Epson Printer RX-80 F/T), Software (University of Minnesota Apple // Sequence Analysis Program, Roger Larson, Joachim Messing, Apple // USCD Pascal, Version 1.1, 1980, Textverarbeitung Apple Writer //e, 1981-2, Paul Lutus),
Ultrazentrifuge (Beckman L5-65), Kühlzentrifugen (Sorvall Superspeed RC-5, Beckman J-21 B), Vertikalrotor TV 850 (Sorvall), Rotoren Ti-60, Ti-50, JA-20, JA-14 (Beckman), Tischzentrifuge (Heräus Christ Labofuge 2), Eppendorf-Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5412), Speed Vac Concentrator (Bachofer),
Szintillationsmesser (Tricarb Modell 3320, Packard Instruments Co., Frankfurt), Mini Monitor Szintillationsmesser (Typ 5.40, Mini Instruments Ltd., Essex), pH-Meter (Knick, Typ 511), Kolorimeter zur Zelldichtemessung (Klett-Summerson Typ 800-3 mit Blaufilter Nr. 42 und Grünfilter Nr. 54, MFB Co. Inc., New York), Durchflußphotometer (Isco Absorbance/Fluorescence Monitor UA5 mit eingebautem Schreiber und optischer Einheit Typ 6), Spektralphotometer (Gilford Modell 250 mit Recorder 1100, Aminco DW-2 UV/VIS, Perkin-Elmer 550 A), Ultraschallgerät (Branson Sonifier B-12), Zellhomogenisator (Braun Melsungen Typ 853038), Micro-Dismembrator (Typ II, Braun Melsungen), Mikroskop (Zeiss Standard 14), Waagen (Mettler P 1000 N, P 1200), Microwaage (Sartorius 2414), Automatik-Pipetten (Pipetman, Gilson, Finnpiquette), Sterile Arbeitsbank, Flowhood (Ceag), Autoklaven (Webeco Typ A5, Melag Typ 23), Spritzen für Sterilisation (Sartorius Ultra-Aspekt, Antlia SP 050/2), Schüttler (New Brunswick Modell G 25 und Modell G 10, thermostatisiert), Rolltrommel (New Brunswick TC 5), Rotationsverdampfer (Büchi Rotovapor R), Magnetrührer (IKA Combimag), Whirlmix (Cenco), Wrist Action Shaker (Burrell Modell 75), Netzgeräte (Desaga Modell 500/500, EC 500, EC Apparatus Co., Florida, 2297 Macrodrive 5, LKB), Elektroelutionsapparat (Isco, Modell 1750 Electrophoretic Concentrator), Sequenzier-Elektrophorese (LKB 2010-001 Macrophor System), Peristaltische Pumpe (Perpex 2115, LKB), Fraktionssammler (7000 Ultrorac, LKB), UV-Lampe (Desaga Min UVIS), Tiefkühlschrank -70°C (Ceco 1130), Gefrierschränke -20°C (Privileg, Bosch), Folienschweißgerät (Bosch), Eismaschine (Scotsman), Wasserbäder (Julabo Exatherm P5, Braun Thermomix, GFL), Brutschrank (Heräus Typ VT 5050 EK), DNA-Gel Photographie (Polaroid MP4, Film Typ 665, 254 nm UV: RU-VE Chroma 41, Vetter GmbH, Wiesloch), Densitometer (Instrumentation Laboratory Boskamp GmbH), Glaskapillaren (0.1 mm, Fa. Glas, Berlin), Röntgenfilme (Fuji RX3, Kodak XAR-5), Röntgenverstärkungsfolien (Du Pont), Röntgenfilmkassetten (Siemens).

2. Plasmid-Vektoren

In dieser Arbeit wurden die Vektoren pBR 322 (11), pBR 325 (12), pBR 328 (13), pHc 79 (14), pLC 544 (15), YEP 13 (16), pBC 351 (17), pCEN 11-3-1 (18), M13 mp8, M13 mp10 und M13 mp11 (19) verwendet.

pBR 322 ist ein Plasmid-Vektor, der ein Ampicillin-, ein Tetracyclin-Resistenzgen und eine Region, die zur Replikation in *E. coli* befähigt, enthält. Durch Insertion von Restriktionsfragmenten in das Gen für Ampicillin- bzw. Tetracyclin-Resistenz besteht die Möglichkeit der Selektion rekombinanter Moleküle. pBR 325 ist von pBR 322 abgeleitet und besitzt zusätzlich ein Gen für Chloramphenicol-Resistenz. pBR 328 ist bis auf die Deletion einer 'inverted repeat' Sequenz mit pBR 325 identisch.

pHc 79 ist ein Cosmid-Vektor der durch Einbau eines Teils des Bacteriophagen Lambda mit den kohäsiven Enden des Phagen in pBR 322 erhalten wurde. Durch diese 'cos' Region wird eine *in vitro* Verpackung rekombinanter Phagen mit großen (~40 kb) eingebauten Fremd-DNA Fragmenten ermöglicht.

pLC 544 ist ein Derivat von pBR 322, in dessen EcoRI-Schnittstelle ein Fragment mit dem TRP1 Gen von *S. cerevisiae* und dem ARS1-Element, welches zur Selbstreplikation des Plasmids in Hefe befähigt, eingebaut wurde.

YEp 13 besitzt zusätzlich zum pBR 322 das LEU2 Gen und Teile des 2 Micron Plasmids von Hefe. Auch dieser Vektor hat die Fähigkeit zur Selbstreplikation in Hefe.

pBC 351 und pCEN 11-3-1 enthalten neben pBR 322 und dem oben erwähnten TRP1/ARS1 EcoRI Hefe-Fragment je eine Centromer-Region (CEN3 bzw. CEN11) der Hefe-Chromosomen III bzw. XI.

Die Vektoren M13 mp8, M13 mp10 und M13 mp11 leiten sich von dem einzelsträngigen *E. coli* Phagen M13 ab und besitzen neben Teilen des Lac-Operons Region eine Polylinker-Region mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen und unterschiedlicher Orientierung derselben in M13.

Aus pHc 79 und pLC 544 wurden von M. Schweizer der Cosmid-Shuttle Vektor pMS 201 (8) konstruiert. pMS 201 und YEp 13 wurden in diesem Institut zur Herstellung von Hefe-DNA Genbanken benutzt.

pMS 201, pBR 322, pBR 325, pBR 328, pBC 351 und pCEN 11-3-1 dienen als Vektoren zur Subklonierung von Hefe FAS DNA.

M13 mp8, M13 mp10, M13 mp11 wurden als Vektoren bei der Klonierung von FAS Fragmenten zur DNA-Sequenzierung eingesetzt.

3. Enzyme

Zymolyase 60 000 aus *Arthrobacter luteus* (Seikagaku Kogyo Co. Ltd., Tokio), Glusulase mit Sulfatase-Aktivität, 1536 U/ml und Glucuronidase-Aktivität, 12 723 U/ml (Endo Laboratories Inc, New York), Lysozym 2200 U/mg (Serva, Heidelberg),

Restriktionsendonukleasen: AccI, BamHI, BglII, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindIII, PstI, PvuII, SalI, Sau3A, ScaI, SmaI, SphI, XbaI, XhoI, (Boehringer, Mannheim),

AluI, AvalI, ClaI, NcoI (New England Biolabs, Schwalbach),

Bal31, BclII, HincII, HpaII (Bethesda Research Laboratories, Neu Isenburg),

T4 DNA Ligase (Biolabs, Amersham Buchler, Braunschweig), DNase I, grade I (Serva, Heidelberg), Ribonuklease A, 50 000-75 000 U/mg, bovine pancreas type II-A (Sigma, München), Ribonuklease T1 100 000 U/ml (Boehringer), DNA-Polymerase I (Biolabs, Boehringer), Alkalische Phosphatase (Boehringer), DNA-Polymerase, 'Klenow'-Fragment (Amersham), S1 Nuklease, Polynukleotid-Kinase (BRL).

4. Chemikalien

Jod-125 (Na^{125}I), 100 mCi/ml, α - ^{32}P dATP, 3000 Ci/mmol oder 400 Ci/mmol, α - ^{35}S dATP, 3000 Ci/mmol, universeller M13 Sequenzierungsprimer, 'reverse' M13 Sequenzierungsprimer (Amersham Buchler, Braunschweig),

M13 Hybridisierungsprimer (PL, Pharmacia, Freiburg)

Silan 6F 31 (Wacker-Chemie, München),

Repelcote (2 % Dimethyldichlorosilan in Trichloräthan) (BDH, Poole, England),

Oligo(dT)Cellulose, Cycloheximid, Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Chloramin T, Dodecylsulfat Na-Salz, Polyäthylenglykoll 4000 und 6000, Dithiothreitol, Xylencyanol, Harnstoff, Ammoniumpersulfat, Bromphenolblau, Glycin p.A., Triton X-100, Sucrose p.A. (Serva, Heidelberg),

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Rinder Serumalbumin, Polyvinylpyrrolidon, Fraction V Protein, Acrylamid, TEMED (Tetramethyläthylendiamin), N,N'-Methylen-bis-acrylamid,

MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure), PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-äthansulfonsäure)), Trizma Base, Tris-HCl, Agarose, low EEO, IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid), Sepharose CL6B-200, Dowex MR-3, mixed resin (Sigma, München),

Bluo-Gal, X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Galactopyranosid), Bam/Sma-Adaptor, NACS (nucleic acid cleaning system), low melting point Agarose (BRL),

ATP, Formamid, Dimethylformamid, Formaldehyd, Phenol, Borsäure, Isopropylalkohol, NaCl, Paraffin, dünnflüssig (Fluka, Neu-Ulm), CsCl (Ega, Steinheim),

Harnstoff, Na-Acetat, NaJ, CaCl_2 , RbCl, MgCl_2 , Na_3 -Citrat, Dimethylsulfoxid, Mercaptoäthanol, Äthanolamin, Na-Dithionit, Barbital, Ethidium Bromid, EDTA Titriplex III, Tween 40, Sorbit (Merck, Darmstadt),

Hydroxylapatit 'DNA-grade' Bio-Gel HTP (Bio-Rad, Richmond),

Quickszint 212 (Zinsser, Frankfurt),

Antibiotic Medium No.3 (Oxoid, Wesel),

Bacto-Trypton, Bacto-Pepton, Yeast Extract, Bacto Brain Heart Infusion, Nutrient Broth, Yeast Nitrogen Base, Bacto-Agar (Difco, Detroit),

Ficoll, BrCN-aktivierte Sepharose, Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala),

Filterpapiere, No. 3MM und No. 40 (Whatman, Maidstone, England),

Blotting Papier, GA 003, Filterpapier No. 470, Nitrocellulose BA 85 (Schleicher & Schuell, Dassel),

Biodyne Transfer Membran (Pall Ultrafine Filtration Corp., Glen Cove, New York),

Glaspulver (American Flint Glass Corp., New York).

5. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende, haploide Hefe-Stämme eingesetzt:

SC 9, Originalbezeichnung X 2180-1 A (a *SUC 2 mal gal 2 CUP 1*) erhalten von Dr. R. K. Mortimer (Berkeley), wurde zur Herstellung der Hefe-Genbänke benutzt.

SC 167 (alpha *ade 1*) stammt ab von SC 18 (*ade 1*, Dr. M. Esposito, Chicago) und diente als Kontrolle bei immunologischen Versuchen.

SC 3725 C (a *his 3 trp Car*) wurde uns von Dr. D. Gallwitz, Marburg zur Verfügung gestellt und für die Herstellung von *his/fas*-Doppelmutanten als Rezipientenstämme für Transformationsversuche verwendet.

Die mRNA der Hefestämme *rna1* (a, *rna1 ade1 ura1 gal1 tyr1 his7 lys2 trp1*) (20) und *rna2* (a, *rna2 ade1 ura1 his7 met*) (21) wurde auf Vorstufen von *FAS1* mRNA untersucht.

Die eingesetzten Fettsäuresynthetase-defekten Hefemutanten (*fas*-Mutanten) kamen aus der in diesem Institut vorhandenen Sammlung (22).

6. *E. coli* Stämme

Die Klone 33 F1, 102 B5 und 122 B1 einer Hefe-Genbank von Dr. John Carbon, Santa Barbara, Kalifornien, waren durch Transformation von Col E1/Hefe-DNA Hybridplasmiden in den *E. coli* Stamm JA 221 (*hsd M hsd R⁻ delta trp E5 rec A1 leu B6 lac Y*) erhalten worden (23).

Zur Präparation von Colicin E1 (24) diente der *E. coli* Stamm JC 411 (F⁻ *gal 6 lac Y1 mal A1 mt1 2 xyl 7 arg G6 his G leu 6 met B1 str A104 sup E44 Lambda R⁻ T1 A2 Col E1*) (25).

Als Kontrolle bei immunologischen Versuchen mit Plasmid-haltigen *E. coli* Klonen diente der Plasmid-freie *E. coli* Stamm AB 1157 (F⁻ *ara 14 gal k2 lac Y1 mt1 1 xyl 5 arg E3 his 4 leu 6 pro A2 thr 1 thi⁻ str 31 sup 37am Lambda R⁻ T6 33*) (26).

Zur Klonierung von Plasmiden der im hiesigen Institut hergestellten Hefe-Genbänke wurde der *E. coli* Stamm SK 2881 (F⁻ *gal⁻ lac⁻ srl leu C thi⁻ T1 R hsd R4 rec A⁻ sbc B15 end A⁻*) (27) eingesetzt.

Zur Subklonierung von *FAS* DNA Fragmenten diente der Stamm RR1 (F⁻ *hsdS20 recA⁻ ara14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mt11 supE44 lambda⁻*), der uns von S. Kushner, University of Georgia, USA zur Verfügung gestellt wurde (28).

Als Wirtsstamm für M13 Klone diente der *E. coli* Stamm 71-18 (F⁻ *lac I^{q2} delta M15 pro, delta <lac, pro>*) (29).

Alle *E. coli* Stämme wurden in Fläschchen mit je 4 ml Nutrient Agar (s.u.) bei Raumtemperatur oder in 50% Glycerin bei -70°C aufbewahrt.

Hefe-Stämme und Mutanten wurden ebenfalls in Fläschchen mit je 4 ml YEP-Agar (s.u.), Hefe *FAS* Transformanten in YEP Agar (selektiver Druck gegen Plasmid-Verlust !) bei 4°C oder in 50% Glycerin im Tiefkühlschrank (-70°C) aufbewahrt.

7. Medien

Die bei den verschiedenen Medien gemachten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Endvolumen von 1 l; die Substanzen wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

(a) E.coli-Kulturen

Luria Broth (LB): 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, 0.2 g NaOH. Feste LB-Nährböden enthielten zusätzlich 2 % Bacto-Agar.

Nutrient Agar: 6 g Nutrient Broth, 8 g NaCl, 6 g Bacto-Agar.

Penassay-Festmedium (PA): 17.5 g Antibiotic Medium No. 3, 20 g Bacto-Agar.

S-Agar: 32 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, 0.2 g NaOH, 15 g Bacto-Agar.

Brain Heart Infusion (BHI): 37 g Bacto Brain Heart Infusion.

Glucose/Minimal-Medium: 10.5 g K_2HPO_4 , 4.5 g KH_2PO_4 , 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g Na-Citrat ($\times 2 H_2O$), 0.2 g $MgSO_4$ ($\times 7 H_2O$), 5 Microgramm Thiamin HCl, 2 g Glucose

Trypton-Hefeextrakt-Medien:

1xTY: 8 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl

2xTY: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl

H Platten: 10 g Trypton, 8 g NaCl, 12 g Agar

H Top-Agar: 10 g Trypton, 8 g NaCl, 8 g Agar

Falls im Text angegeben wurden den Medien nach der Sterilisation Antibiotika zu einer jeweiligen Endkonzentration von 20 mg/l zugesetzt.

Das Standard-Kulturmedium für *E.coli* war LB. Agar-Platten mit Antibiotik-Zusatz wurden aus Penassay-Medium hergestellt.

S-Agar wurde zur Anzucht von *E.coli* Klonen für immunologische Untersuchungen eingesetzt.

Brain Heart Infusion wurde dann benutzt, wenn in einem kleinen Volumen Plasmid-haltige *E.coli* Zellen zu möglichst hoher Zelldichte anwachsen sollten; im übrigen sollen *E.coli* Klone, auch ohne Selektionsdruck durch Antibiotika, in BHI ihre Plasmide nicht verlieren.

Glucose/Minimal-Medium, TY- und H-Medien dienten zur Anzucht des F'-Plasmid haltigen *E. coli* Stammes 71-18.

(b) Hefe-Kulturen

Hefeextrakt/Pepton-Medium (YEP): 20 g Saccharose, 5 g Hefeextrakt, 6.7 g Pepton, 5 g K_2HPO_4 , 5 g KH_2PO_4 .

Minimal-Medium (MM): 20 g Saccharose oder Glucose, 6.7 g Yeast Nitrogen Base.

Sporulationsmedium: 2.5 g Hefeextrakt, 10 g K-Acetat, 5 g K_2HPO_4 , 5 g KH_2PO_4 .

Fettsäure-haltige Medien (FS): für Fettsäure-bedürftige Hefemutanten wurde dem Medium 1% Tween 40 und 0.03% Butterhydrolysat zugesetzt.

Regenerationsmedien (Reg): Medien zur Regeneration von Sphäroplasten hatten eine der oben angegebenen Zusammensetzung und enthielten zusätzlich noch 182 g (=1M) Sorbit und 5 ml YEP.

Top-Agar zur Einbettung von Sphäroplasten war Regenerationsmedium, welches nach dem Autoklavieren bei 45°C flüssig gehalten wurde.

Festmedien: Für Agar-Platten wurden den Medien noch zusätzlich 2% Agar zugesetzt.

Alle Medien wurden 40 min bei 121°C autoklaviert, Antibiotika gegebenenfalls nach Abkühlen auf 50°C zugegeben.

8. Proteinbestimmungen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen oder Zellsätzen wurde die Methode von Whitaker und Granum (30) benutzt. Danach mißt man die Absorption einer entsprechend verdünnten Proteinlösung bei 235 nm und bei 280 nm und errechnet aus den Absorptionswerten die Proteinkonzentration nach der Formel:

$$\text{Proteinkonzentration} = (A_{235} - A_{280}) / 2.51 \text{ (mg/ml)}$$

Die Proteinkonzentration in der Küvette sollte bei 0.1 - 1 mg/ml liegen. Nukleinsäuren beeinträchtigen die Messung nicht, da sie bei 235 nm und bei 280 nm gleich stark absorbieren. Diese Methode wurde mit der Microbiuret-Methode nach Itzhaki und Gill (31) verglichen und lieferte im Rahmen der Meßgenauigkeit identische Werte.

9. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei gilt im Rahmen der hier erforderlichen Genauigkeit:

$$\text{DNA-Konzentration} = A_{260} \times 50 \text{ (Microgramm/ml)}$$

$$\text{RNA-Konzentration} = A_{260} \times 36 \text{ (Microgramm/ml)}$$

Als Kriterium für die Verunreinigung von DNA-Lösungen mit Proteinen wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dieses sollte bei reinen Nukleinsäurelösungen den Wert 2 annehmen (32).

10. Anzucht von *E.coli* und Hefe Zellen

E.coli Zellen wurden auf Festmedium im Brutschrank bei 37°C angezüchtet. Flüssigkulturen wuchsen bei 37°C entweder in Reagenzgläsern (2 - 5 ml) auf einer Rolltrommel oder in Erlenmeyer-Kolben auf einer geeigneten Schüttelplattform.

Hefe Zellen wurden auf Festmedien bei 30°C im Brutschrank, als Flüssigkulturen bei 30°C in Erlenmeyer- oder Fernbach-Kolben unter Schütteln angezüchtet.

11. Plasmid-DNA Isolierung (33)

1 l LB mit geeignetem Antibiotik-Zusatz wurde mit frisch ausgestrichenen Zellen eines Plasmid-haltigen *E. coli* Klon beimpft und bei 37°C bis zur mittel-logarithmischen Phase (150 Klett-Einheiten, Grünfilter) geschüttelt. Dann wurden der Kultur zur Amplifizierung der Plasmid-Kopienzahl (34) 1.2 ml einer 10 %-igen Chloramphenicol Lösung in Äthanol zugegeben und weiter mindestens 10 h bei 37°C geschüttelt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (JA-14, 8000 upm, 4°C, 5 min) geerntet, in 5 ml 50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 resuspendiert, durch Zugabe von 10 ml 0.2 M NaOH, 1% SDS lysiert und die Proteine durch Zusatz von 5 ml 3 M K-Acetat pH 4.8 und Zentrifugation (JA-14, 13 000 upm, 4°C, 20 min) ausgefällt. Der die Plasmid-DNA und die zelluläre RNA enthaltende Überstand - die chromosomale DNA wird größtenteils, da mit Proteinen vergesellschaftet, mit abzentrifugiert - wurde vorsichtig in JA-20 Plastikzentrifugenbecher abgegossen, mit >0.6 Vol -20°C kaltem Isopropanol versetzt und nach kurzem Mischen bei 16 000 upm, 4°C, 20 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde *in vacuo* getrocknet, in 5 ml 50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 aufgenommen, 30 Microliter RNase A (10 mg/ml in 50 mM Na-Acetat pH 4.8, zur Inaktivierung von DNase-Aktivität durch Kochen der RNase-Lösung und Abschrecken auf Eis vorbehandelt) und 1 Microliter T1 RNase (100 U) zugegeben und bei 37°C 45 min inkubiert. Anschließend wurde mit 5 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) gesättigtem Phenol ausgeschüttelt, die Phasen wurden durch Zentrifugation (JA-20, 14 000 upm, 4°C, 20 min) getrennt, die wässrige Phase abgehoben, 0.5 ml 5 M NaCl und 20 ml -20°C kalter Äthanol zugegeben, gemischt und 20 min bei 16 000 upm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde wie oben getrocknet und in 1.5 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) gelöst.

Zur Reinigung der Plasmid-DNA von restlicher RNA und chromosomaler DNA wurde anschließend die DNA über eine Sepharose 4B Säule gegeben (35). Die Säule (r=1 cm, l=40 cm) wurde mit 0.5 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 äquilibriert, die Probe aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Das Eluat wurde kontinuierlich mit einem UV Monitor (Isco UA-5 mit eingebautem Schreiber) bei 280 nm verfolgt (Abb.2) und bei einer Tropfgeschwindigkeit von 0.35 ml/min in Fraktionen zu 7 ml aufgefangen. Die Spitzenfraktionen des ersten Gipfels wurden vereinigt, mit >0.6 Vol Isopropanol bzw. mit >2 Vol Äthanol bei -70°C gefällt und die Plasmid-DNA abzentrifugiert (JA-20, 16 000 upm, 4°C, 20 min). Die DNA wurde nach Trocknen im Vakuum in 1 ml TE-Puffer gelöst.

Die Ausbeute eines 1 l Ansatzes betrug in der Regel 0.7-3 mg gereinigte Plasmid-DNA.

12. Plasmid-DNA Präparation für analytische Zwecke ('mini-screen' Methode) (33)

2.5 ml LB mit Antibiotikum-Zusatz (20 mg/ml) wurden mit einem *E. coli*-Klon beimpft und 10 - 14 h bei 37°C auf einer Rolltrommel inkubiert.

1.5 ml der Übernachtskultur wurden in einem Eppendorf-Hütchen 30 sek abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge), die Zellen kurz durch Umstülpen der Hütchen auf Filterpapier getrocknet, in 0.1 ml 50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 resuspendiert, mit 0.2 ml 0.2 M NaOH, 1 % SDS und 0.15 ml 3 M K-Acetat pH 4.8 versetzt, kurz gemischt und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde von den ausgefällten Proteinen und chromosomaler DNA abgegossen, 1 ml -20°C kaltes Isopropanol zugegeben und nach Mischen 5 min zentrifugiert. Die ausgefällten Nukleinsäuren wurden mit -20°C kaltem 66 %igem Äthanol gewaschen, nochmals 3 min zentrifugiert und im Vakuum (Speed Vac) getrocknet. Der trockene Niederschlag wurde in 0.05 ml 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 gelöst.

Aus dem oben genannten Ansatz wurden meist 0.03 - 0.05 mg Plasmid-DNA erhalten.

13. CsCl/Ethidium Bromid Dichtegradienten Zentrifugation von Plasmid-DNA (36)

Für die Abtrennung von verdrillter ('supercoiled') Plasmid-DNA von linearisierten oder offenen Plasmid-Ringen und restlicher chromosomaler DNA wurde nach der Reinigung über Sepharose 4B noch eine CsCl/Ethidium Bromid Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden pro Gradient ca. 0.5 mg DNA in 7.43 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0), 7.56 g CsCl und 0.25 ml Ethidium Bromid (10 mg/ml) gelöst, mit Paraffin überschichtet und bei 42 000 upm und 20°C, 48 h in einem Ti50 Rotor zentrifugiert. Die getrennten DNA-Banden wurden im Gradienten unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abb.3) und die untere Bande ('supercoiled' Plasmid-DNA) mit einer Spritze (Kanüle No.1) abgezogen. Das Ethidium Bromid wurde durch dreimaliges Ausschütteln mit je 1 Vol CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt, die wäßrigen Phasen über Nacht im Kühlraum gegen 2x 3 l TE-Puffer dialysiert, dann 0.3 M an Na-Acetat gemacht und mit 2 Vol Äthanol bei -70°C die Plasmid-DNA ausgefällt.

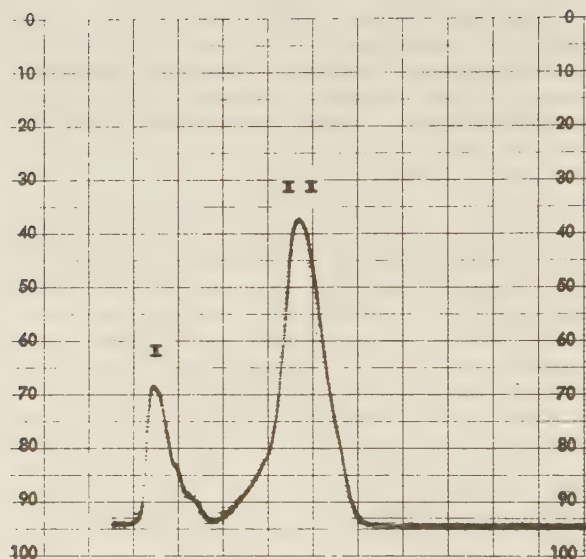


Abb.2: Reinigung einer Plasmid-DNA Präparation
durch Sepharose 4B Chromatographie

Die vorgereinigte Plasmid-DNA des Klons pMS 3021 (ca. 2.4 mg Nukleinsäuren isoliert aus 1 l LB-Medium), wurde auf eine Sepharose 4B Säule ($r = 1$ cm, $l = 40$ cm) aufgetragen und mit 0.5 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 eluiert (35). Die Absorption des Eluats wurde kontinuierlich bei 254 nm verfolgt. Auf der Skala bedeutet 100 = 1 O.D.; die Säule lief mit 0.35 ml/min und es wurden Fraktionen zu 7 ml aufgefangen. Der erste Gipfel (I) enthält die Plasmid-DNA, der zweite (II) RNA.

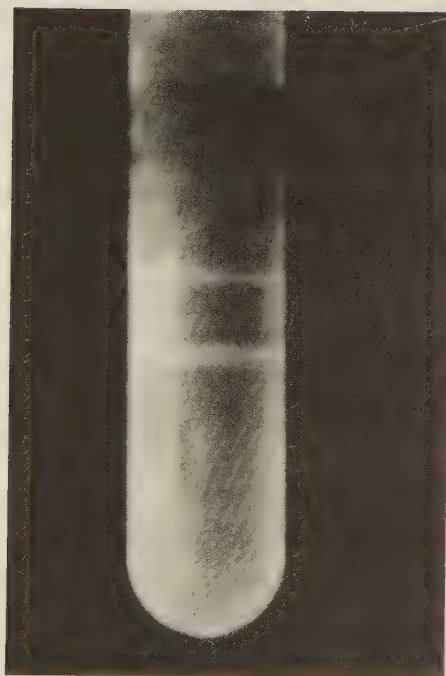


Abb.3: CsCl-Ethidium Bromid Dichtegradientenzentrifugation
von Plasmid-DNA (36)

0.5 mg Plasmid-DNA pMS 3021, die zuvor über Sepharose 4B von RNA befreit worden waren, wurden in 7.43 ml 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 gelöst, 7.56 g CsCl eingewogen und gelöst, 0.25 ml Ethidium Bromid - Lösung (10 mg/ml) zugesetzt und in einem Ti50 Rotor 48 h bei 42 000 rpm und 20°C zentrifugiert. Dann wurde unter UV-Beleuchtung die untere Bande, welche die supercoiled Plasmid-DNA enthält, mit einer Spritze abgezogen. Die obere Bande besteht aus linearisierten und offenen Ringen von Plasmid-DNA, außerdem enthält sie Reste chromosomaler DNA.

14. Restriktionsendonuklease-Spaltungen

Plasmid-DNA's und chromosomale Gesamt-DNA's wurden mit 1U der jeweiligen Restriktionsendonuklease pro Microgramm DNA in TAM-Puffer (66 mM K-Acetat, 33 mM Tris, 10 mM Mg-Acetat, 0.5 mM Dithiothreitol, 0.1 mg/ml Rinderserumalbumin pH 7.9) (37) bei 37°C für mindestens 1 h inkubiert und die Enzyme durch Erhitzen (5 min) auf 60°C inaktiviert. Bei Verwendung von Bcl31 wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Vol 0.2 M EGTA und 5 min Inkubation bei 60°C gestoppt.

15. Agarose-Gel Elektrophorese von DNA

DNAs wurden in Mini-Gelen (7.5 x 7.5 cm, 14 Taschen) oder in Gelen von 22.5 x 15.5 cm (13 - 32 Taschen) bei 100 - 150 V elektrophoresiert. Die Gele bestanden aus 0.8 - 1.5 %-iger Agarose in 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.3) (38) oder 1xTA (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA pH 8.1) (38) und wurden nach dem Lauf in 0.1 % Ethidium Bromid gefärbt und unter UV-Beleuchtung photographiert. Für die präparative Elektrophorese zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde auch eine spezielle, niedrig schmelzende (45°C) Agarose ('low melting point agarose', BRL, Sigma) verwendet. Präparative Gele wurden in Bahnen von je 23 x 2.5 cm gegossen und liefen 12 - 20 h mit 30 - 60 V bei Raumtemperatur.

16. Polyacrylamid-Gel Elektrophorese von DNA

Für die Restriktionskartierung kleiner DNA-Fragmente und deren Isolierung wurden 4 - 8 %ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Dazu wurde eine 38 % Acrylamid, 2 % N, N'-Methylen-bis-acrylamid Stammlösung entsprechend der gewünschten Prozentzahl mit H₂O verdünnt, je 1/10 Vol 10xTBE und Glycerin zugesetzt, die Lösung entgast und dieser Mischung pro 100 ml zur Polymerisation 0.5 ml 10 % Ammoniumpersulfat und 30 Microliter TEMED zugegeben. Anschließend wurde hiermit ein Vertikalgel (160 x 140 x 1.5 mm) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die restriktionsgespaltenen DNA-Proben aufgetragen und mit 1xTBE als Elektrophorese-Puffer bei 50 - 100 V und Raumtemperatur elektrophoresiert.

17. Polyacrylamid-Gel Elektrophorese von Proteinen

Zur Auftrennung der FAB Untereinheiten und zur Untersuchung von *E. coli*- und Hefe-Lysaten wurden SDS/Harnstoff Gele (39) verwendet. 16.2 g Harnstoff, 8.4 ml Acrylamid-Stammlösung (222 g/l Acrylamid, 6 g/l Methylenebisacrylamid, deionisiert mit Dowex MR-3), 1.8 ml H₂O, 22.2 ml Gelpuffer (51.5 g/l Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 7.8 g/l NaH₂PO₄ x 1 H₂O, 2 g/l SDS) wurden gemischt, entgast, 0.6 ml 10% Ammoniumpersulfat und 0.072 ml TEMED zugesetzt und ein Vertikalgel (160 x 140 x 1.5 mm) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die Proben (2 Microgramm reine FAS; 20 Microgramm Zellextrakt-Protein) in 8 M Harnstoff, 5 mM Mercaptoäthanol, 1 % SDS, 0.1 % Bromphenolblau durch 5 min Kochen denaturiert, aufgetragen und mit 1:1 verdünntem Gelpuffer bei 20 V laufen gelassen bis die Bromphenolblau-Farbbande am unteren Ende des Gels angelangt war. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend nach der 'Western'-Transfer Methode auf Nitrocellulose Filter übertragen.

18. Isolierung von DNA-Fragmenten

Restriktionsgespaltene DNAs wurden, wie oben beschrieben, präparativ elektrophoresiert und die gewünschten Fragmente nach einer der folgenden Methoden isoliert:

(a) (40) Nach Elektrophorese in niedrig schmelzender Agarose und Anfärben mit Ethidium Bromid wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einer Rasierklinge möglichst genau ausgeschnitten, in Eppendorf-Hütchen mit 1 Vol 0.5 M NaCl in 1xTA versetzt und bei 65°C unter gelegentlichem Mischen (Whirlmix) so lange inkubiert bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Dann wurde 1 Vol mit 0.3 M Na-Acetat gesättigtes Phenol zugegeben und nach gründlichem Mischen sofort 10 min in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit Phenol und anschließend 2x mit Äther extrahiert, dann die DNA mit Äthanol gefällt und die Fällung bei -70°C stehen gelassen. Nach einigen Stunden wurde die Fällung 10 min zentrifugiert, der Niederschlag mit 66 %-igem Äthanol gewaschen, *in vacuo* getrocknet und schließlich in 20 Microliter TE-Puffer gelöst.

(b) Nach der 'freeze-squeeze' Methode (41) wurden die gespaltenen DNAs in 'normaler' Agarose (low EEO, Sigma) elektrophoresiert, die Banden sorgfältig ausgeschnitten und die Agarosestückchen in kleine Eppendorf-Hütchen (0.5 ml) gegeben, die zuvor am Boden mit einer Nadel perforiert worden waren und etwas Glaswolle enthielten. Die DNA-haltigen Agarosestückchen wurden dann mindestens 5 h bei -70°C eingefroren. Die kleinen Eppendorf-Befäße wurden dann mit den gefrorenen Agarosestückchen in 1.5 ml Eppendorf-Hütchen gesteckt und sofort bei Raumtemperatur 10 min zentrifugiert. Dabei tritt die Flüssigkeit der Agarose mit der DNA vom kleinen Hütchen durch die Poren ins große Hütchen über, die Agarose wird durch die Glaswolle zurückgehalten. Die eluierte DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Vol 3 M Na-Acetat mit Äthanol gefällt (-70°C, >5h), zentrifugiert, mit 66 %-igem Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20 Microlitern TE-Puffer aufgenommen.

(c) Nach der NaJ-Methode (42) wurde restriktionsgespaltene DNA in Tris-Acetat Agarose-Gelen (s.o.) elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden nach EtBr-Färbung möglichst genau mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, die Agarosestückchen mit der DNA gewogen und in sterile 10 ml Plastikgefäße gegeben. Dann wurden 2 ml/g Agarose einer gesättigten NaJ-Lösung (454 g NaJ in 225 ml H₂O mit 2 g Na₂SO₃) zugegeben und bis zum vollständigen Auflösen der Agarose ca. 30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Anschließend wurde eine Spatelspitze (ca. 10 mg) Glaspulver, welches zuvor mit 0.1 N HCl, H₂O, 0.1 N NaOH und wiederum H₂O gewaschen und anschließend getrocknet worden war (43), zugesetzt und die Gefäße 2 - 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt, so daß die Glaspartikel ständig in Suspension gehalten wurden. Dann wurde in einer Tischzentrifuge 5 min bei 2 500 upm zentrifugiert, der Überstand vom Glaspulver vorsichtig abgehoben, 0.5 ml einer Lösung von 7 Teilen gesättigter NaJ-Lösung (s.o.) und 3 Teilen H₂O zugegeben und 20 min schütteln gelassen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Glaspartikel mit der gebundenen DNA 2 Mal mit je 0.5 ml 50 % Äthanol, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.4 durch je 20 min Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen und schließlich die DNA durch 0.3 ml 0.2 M NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA pH 7.4 bei 37°C unter Schütteln von den Glaspartikeln eluiert. Nach Klarzentrifugieren der Suspension in einer Tischzentrifuge wurde der DNA-haltige Überstand abgehoben, 0.3 M an Na-Acetat gemacht, >2 Vol Äthanol zugegeben und die Fällung >5 h bei -70°C stehen gelassen. Anschließend wurden die Fragmente abzentrifugiert und nach Trocknen im Vakuum in je 20 Microlitern TE-Puffer (s.o.) gelöst.

19. Ligation von DNA

Insgesamt 0.5 - 2 Microgramm der zu ligierenden DNAs wurden in unterschiedlichem, dem jeweiligen Experiment angepaßtem, Verhältnis zueinander in 1xLigase-Puffer (25 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0.2 mM Spermidin HCl pH 8.0) (44) gemischt und je 5 min bei 60°C, 37°C und Raumtemperatur gehalten. Dann wurden auf Eis 0.5 Microliter 100 mM ATP und 0.5 Microliter T4 DNA-Ligase (0.5 U des Amersham-Enzyms bzw. 2 U des Biolabs-Enzyms; die Einheiten sind unterschiedlich definiert) zugegeben und >10 h bei 14°C inkubiert. Gelegentlich enthielten die Ligationsansätze zusätzlich 15 % Polyäthylenglykoll 6000 und wurden dann bei Raumtemperatur >10 h inkubiert; in Gegenwart von Polyäthylenglykoll ligieren vor allem DNAs mit glatten Enden besser (45).

Die ligierten DNAs wurden elektrophoretisch untersucht oder direkt nach *E. coli* transformiert.

20. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden zwei verschiedene Methoden verwandt, wobei die erste einfacher und schneller durchzuführen, allerdings die Transformationsrate niedriger war. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf 1 Transformationsansatz.

(a) (46) 5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie eines frisch ausgestrichenen *E. coli* Stammes (RR1 oder SK 2881) beimpft und bei 37°C bis zur mittel-logarithmischen Phase wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (JA-20, 8000 upm, 4°C, 5 min) und in 0.5 ml 30 mM CaCl_2 , 10 mM Tris pH 8.0 resuspendiert. Nach 15 min auf Eis wurde wieder wie oben zentrifugiert, die Zellen in 0.05 ml 30 mM CaCl_2 , 10 mM Tris pH 8.0 aufgenommen, in Eppendorf-Hütchen transferiert und die transformierende DNA bzw. das Ligationsgemisch zugegeben. Es wurde dann 15 min auf Eis, 2 min bei 37°C, 1 min auf Eis und zuletzt 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 0.6 ml LB 1 h bei 37°C wachsen gelassen und dann auf entsprechend selektive Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die nach ca. 36 h auftretenden Einzelkolonien wurden nach der oben beschriebenen 'mini-screen' Methode untersucht.

(b) (47) 50 ml LB wurden mit einem Einzelklon eines frisch ausgestrichenen *E. coli*-Stammes (RR1 oder SK 2881) beimpft und bei 37°C bis zur logarithmischen Phase (40 Klett-Einheiten, Grünfilter) wachsen gelassen. 2 ml der Kultur pro Transformationsansatz wurden geerntet (JA-20, 8000 upm, 4°C, 5 min), in 1 ml 10 mM MOPS, 10 mM RbCl pH 7.0 gewaschen, wie oben zentrifugiert, in 1 ml 0.1 M MOPS, 50 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl pH 6.5 vorsichtig suspendiert und 30 min auf Eis gehalten. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Zellniederschlag durch Umstülpen des Zentrifugenglases auf Papiertücher getrocknet, in 0.2 ml 0.1 M MOPS, 50 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl pH 6.5 aufgenommen und 3 Microliter DMSO sowie <10 Microliter DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 30 sek auf 43°C erhitzt, 5 ml Z-Broth (16 g/l Nutrient Broth, 10 g/l Pepton, 2 g/l Glucose) zugegeben, die Zellen 45 min bei 37°C ohne Schütteln wachsen gelassen und zentrifugiert (8000 upm, 5 min). Die Zellen wurden in 0.6 ml LB suspendiert und auf entsprechend selektive Agar-Platten ausplattiert. Das Zentrifugenglas wurde mit 0.6 ml LB ausgespült und diese 'Verdünnung' ebenfalls ausplattiert. Die Transformanten wurden bei 37°C anwachsen gelassen und die Einzelklone nach der 'mini-screen' Methode untersucht.

21. Radioaktive Markierung von DNA durch 'nick translation'
(48)

DNAse I (grade I, Sigma) wurde zu 1 mg/ml in 10 mM HCl gelöst und in Portionen zu 50 Microlitern bei -20°C eingefroren.

Zur Aktivierung wurden zu 50 Microlitern der oben genannten DNAse-Lösung 0.2 ml DNAse-Verdünnungspuffer (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 0.2 mg/ml Rinderserumalbumin pH 7.5) gegeben, kurz gemischt, von dieser Mischung wiederum 10 Microliter zu 10 ml DNAse-Verdünnungspuffer gegeben und 30 min auf Eis inkubiert (effektive Verdünnung 1:5000); der DNAse-Verdünnungspuffer war zuvor sterilfiltriert in Portionen à 10 ml bei -20°C eingefroren worden.

2 Microgramm der zu markierenden DNA wurden in einem Eppendorf-Hütchen mit H₂O auf ein Volumen von 26 Microlitern aufgefüllt, dann wurden 20 Microliter einer 1:1:1:1 (v/v) Mischung von 0.5 mM dTTP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dGTP und 10x Polymerase-Puffer (0.5 M Tris, 50 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol pH 7.5), 1.5 Microliter alpha-³²P dATP (ca. 15 Microcurie, spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol), 1 Microliter der DNAse-Verdünnung (s.o., entsprechend 0.2 ng) und, nach Mischen und 1 min Stehen auf Eis, 1 Microliter DNA-Polymerase I (Boehringer, Biolabs, 5-10 U) zugegeben. Der Ansatz wurde für 2.5 - 3 h bei 14°C inkubiert und anschließend die Enzyme durch 5 min Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

Zur Abtrennung uneingebauter Nukleotide wurden die Proben dann über Sepharose CL-6B 200 gereinigt. Die Sepharose wurde in 1 ml-Spritzen, in die unten etwas Glaswolle (silanisiert) gegeben worden war, mit 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 (TE-Puffer) äquilibriert. Die Proben wurden nach Zugabe von 2 Microlitern Farbmix (50 % Glycerin, 0.3 % Xylencyanol, 0.3 % Bromphenolblau) aufgetragen und mit TE-Puffer eluiert. Sobald die erste Radioaktivität eluierte, wurde tropfenweise (50 Microliter) fraktioniert und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen semiquantitativ mit einem Mini Monitor Szintillationsmesser (Mini Instr. Ltd., Essex) bestimmt. Nach Auffangen des ersten Gipfels wurden die Fraktionen vereinigt und die Radioaktivität der gereinigten nick translatierten DNA mit 2 Microlitern der vereinigten Eluate im Szintillationszähler (Tricarb, Packard) quantitativ bestimmt. Die Ausbeute betrug je nach DNA zwischen 0.5 und 20 x 10⁶ cpm pro Microgramm DNA, bzw. 0.2 - 7 x 10³ cpm/Microliter.

22. Transfer von DNA auf Nitrocellulose-
bzw. Nylon-Membranen (Southern Transfer) (49, 50)

DNA-haltige Agarose-Gele wurden nach Elektrophorese, EtBr-Färbung und Photographie (s.o.) zur Denaturierung der DNA 2 Mal je 15 min in 250 ml 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl und nach Spülen mit Wasser zur Neutralisation 2 Mal je 15 min in 250 ml 0.5 M Tris, 3 M NaCl pH 7.4 unter gelegentlichem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Für ein Gel wurden zwei Nitrocellulose (BA 85, Schleicher & Schuell) bzw. Biotyne (Pall) Membranen, sowie vier Abklatschpapiere (BA 003, Schleicher & Schuell) und zwei Stapel Papiertücher (Apura R100) von 5 cm Höhe auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Das Transfer-'Sandwich' wurde wie folgt aufgebaut:

Auf zwei mit 2xSSPE (20xSSPE = 3.6 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2 M Na-Phosphat pH 7.7) getränkte Abklatschpapiere wurden nacheinander ein ebenfalls in 2xSSPE angefeuchteter Nitrocellulose bzw. Biotin-Filter, das Gel, wieder ein Filter und zwei Abklatschpapiere unter Vermeidung von Luftblasen vorsichtig aufgelegt. Dieser Aufbau wurde zwischen zwei Stapel aus trockenen Papiertüchern gegeben und dann das 'Sandwich' oben mit einem Gewicht von 0.5 - 1 kg (z.B. einem Buch) gleichmäßig beschwert.

Nach 2 h wurde der Transfer durch Abnehmen der Membranen gestoppt und diese nach kurzem Schwenken in 2xSSPE zur Fixierung der DNA mindestens 2 h bei 80°C im Wasserstrahl-Vakuum gebacken.

Dieses Verfahren wurde sowohl bei großen als auch bei Mini-Gelen in gleicher Weise durchgeführt.

23. Isolierung von poly(A) RNA aus Hefe (51)

6 l YEP-Medium wurden mit je 50 Mikrolitern/l einer Vorkultur der verschiedenen, hierzu verwandten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme beimpft und bei 30°C (Wildtyp; bzgl. rna-Mutanten s. Ergebnis-Teil) bis zu einer Zelldichte von 250 Klett Einheiten (Blaufilter) unter Schütteln angezüchtet.

Die Zellen wurden geerntet (JA-14, 6000 upm, 5 min), mit 1/30 Vol 50 mM Tris, 0.1 mg/ml Cycloheximid pH 7.5 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in flüssige Luft gegeben.

Die Zellen wurden unter ständiger Kühlung mit flüssiger Luft 6 Mal 30 sek je Portion mit einem Micro-Dismembrator (Braun) aufgeschlossen, das Zellpulver in flüssige Luft gegeben und nach Abdampfen der flüssigen Luft in 3 ml/g Feuchtgewicht 50 mM Tris, 20 mM EDTA, 2 % SDS, 2 mM Mercaptoäthanol, 1 mg/ml Heparin pH 7.5 suspendiert. Das Zellysate wurde anschließend 3 Mal mit je 1 Vol PCI (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 49:49:2) und 2 Mal mit je 1 Vol CI (Chloroform : Isoamylalkohol 24:1) ausgeschüttelt, dann der wäßrigen Phase 1/10 Vol 3 M Na-Acetat und 2 Vol Äthanol zugegeben und die Fällung bei -70°C eingefroren. Nach >5 h wurde die ausgefällte RNA abzentrifugiert (JA-20, 16 000 upm, 4°C, 20 min), der Niederschlag im Vakuum getrocknet und in 10 mM Tris, 0.5 % SDS pH 7.5 gelöst.

Zur Isolierung von poly(A) RNA (52) wurde die Präparation in Elutionspuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS pH 7.5) zu 1 mg/ml verdünnt, 1/10 Vol 5 M NaCl zugegeben, 5 min bei 65°C inkubiert, schnell auf Eis abgekühlt, und dann über eine Säule (5 ml Spritze) mit 1.3 g oligo(dT) Cellulose gegeben. Die Säule war zuvor mit Bindungspuffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS pH 7.5) äquilibriert worden. Die RNA-Lösung wurde bei Raumtemperatur langsam über die Säule gegeben (20 ml/h), das erste Eluat nochmals aufgetragen und ungebundene RNA dann mit ca. 70 ml Bindungspuffer entfernt. Die poly(A) Fraktion wurde dann mit 10 ml Elutionspuffer ausgewaschen, 0.3 M an Na-Acetat gemacht und mit 2 Vol Äthanol bei -70°C >10 h ausgefällt. Nach Abzentrifugation der RNA wurde sie in 0.5 ml TE-Puffer gelöst und in Portionen zu 50 Mikrolitern bei -70°C eingefroren. Die Ausbeute lag meist bei ca. 0.5 mg.

24. Denaturierende Elektrophorese von RNA (53)

5 Microgramm poly(A) RNA aus Hefe wurden in 50 % Formamid, 2.2 M Formaldehyd, 1xRNA-Puffer (s.u.) 10 min bei 65°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und nach Zusatz von 1/20 Vol Farbmix (50 % Glycerin, 0.3 % Bromphenolblau, 0.3 % Xylencyanol) auf das Gel aufgetragen.

Das Vertikal-Gel (Dicke: 3 mm) bestand aus 0.8 % Agarose in 1xRNA-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA pH 7.0) dem nach Aufkochen und Abkühlen auf 60°C 1/6 Vol 33 %-iger Formaldehyd zugegeben worden war. Die Elektrophorese wurde bei 40 V solange laufen gelassen, bis das Bromphenolblau am Gelende angelangt war (ca. 15 h).

25. Transfer von RNA auf Nitrocellulose-Membranen ('Northern' Transfer) (54)

Das RNA Formaldehyd-Gel wurde nach der Elektrophorese 30 min in 20xSSC (3 M NaCl, 0.3 M Na₃Citrat) getränkt. Der Aufbau des Transfers erfolgte wie oben beim Southern-Transfer beschrieben, mit dem Unterschied, daß Abklatschpapiere und Nitrocellulose in 2xSSC angefeuchtet wurden. Auch die RNA wurde durch Backen bei 80°C in vacuo fixiert.

26. Hybridisierungen mit radioaktiv markierter DNA (55)

Filter mit fixierter DNA oder RNA ebenso wie Nitrocellulose-Filter mit zur Kolonie-Hybridisierung lysierten *E. coli* Klonen wurden unter den gleichen Bedingungen mit radioaktiv markierter DNA hybridisiert.

Die Membranen wurden in Plastikfolien in 5 - 15 ml 50 % Formamid (deionisiert mit gemischtem Ionenaustauscher), 5xSSPE (vgl. S.25), 5xDenhardt's (100xDenhardt's = 2 % Ficoll, 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % Rinderserumalbumin) (56) eingeschweißt und bei 42°C >1 h inkubiert, dann wurde die Vorhybridisierungslösung ablaufen gelassen. Mit ³²P durch nick translation (s.o) markierte DNAs wurden durch 5 min Kochen und Abschrecken auf Eis denaturiert und ca. 1 x 10⁶ cpm den Filtern mit 1 - 5 ml Hybridisierungslösung (50 % Formamid, 5xSSPE, 2xDenhardt's) zugegeben. Die Folien wurden wieder versiegelt und für mindestens 36 h bei 42°C inkubiert, wobei die Hybridisierungslösung gelegentlich per Hand auf den Filtern gleichmäßig verteilt wurde.

Zum Entfernen unspezifisch gebundener Radioaktivität wurden die Filter anschließend 1 h bei 42°C in 2xSSPE, 0.1 % SDS mit mehrfachem Wechseln der Lösung und kurz mit 0.2xSSPE, 0.1 % SDS gewaschen, getrocknet und autoradiographiert (Fuji RX5 oder Kodak X-OMAT, DuPont Röntgenverstärkungsfolien, -70°C).

Die obigen Bedingungen galten für Hybridisierungen, bei denen mit einer Homologie >90 % gerechnet wurde; bei Hybridisierungen mit erniedrigter Stringendität - z.B. zwischen DNA von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomycopsis lipolytica* oder Maus - wurden die Bedingungen variiert.

Nach Hutton (57) gilt:

$$\text{Homologie (\%)} \times 1.5 = \text{Hybridisierungstemperatur} - 16.6 \log (\text{Na}^+) - 0.41 (\% \text{ G+C}) + 0.65 (\% \text{ Formamid}) + 500/\# \text{ bp in Duplex} + 68.5;$$

Setzt man im Duplex DNA/DNA bzw. DNA/RNA für % G+C = 50 und für die Anzahl der bp im Duplex = 100, vereinfacht sich diese Formel zu:

$$\text{Homologie (\%)} \times 1.5 = \text{Hybridisierungstemperatur} - 16.6 \log (\text{Na}^+) + 0.65 (\% \text{ Formamid}) + 53;$$

d.h. es besteht ein quantifizierbarer Zusammenhang zwischen der Sequenzhomologie zweier Nukleinsäureketten und den Versuchsbedingungen (Formamid-Konzentration, Na^+ -Konzentration und Hybridisierungstemperatur), die im Extremfall noch eine Hybridisierung erlauben. Bei den oben beschriebenen Bedingungen hybridisieren demnach DNA-Stränge mit >86 % Sequenzhomologie. Stellt man die Formel um, läßt sich auch die jeweils nötige Formamid-Konzentration für beliebige andere Homologie-Grade errechnen:

$$\% \text{ Formamid} \times 0.65 = 16.6 \log (\text{Na}^+) - \text{Hybridisierungstemperatur} + 1.5 \times (\% \text{ Homologie}) - 53.$$

27. Anreicherung von FAS mRNA durch Gelelution (58)

Auf ein denaturierendes RNA Gel (s.o.) wurden in mehrere Taschen je 20 Microgramm und in eine Tasche 5 Microgramm poly(A) RNA aufgetragen. Nach Elektrophorese wurde der Teil des Gels mit 5 Microgramm RNA abgetrennt, die RNA wie oben beschrieben auf Nitrocellulose transferiert und mit einer FAS DNA-Probe hybridisiert. Der Rest des Gels wurde in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

Nach Hybridisierung und Autoradiographie der abgetrennten Probe wurde die FAS mRNA-haltige Region aus dem restlichen und zwischenzeitlich eingeschweißten Teil des Gels mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und die RNA entweder nach der 'freeze-squeeze' Methode (s.o.) oder durch Elektroelution aus der Agarose isoliert.

Die Elektroelution wurde mit einem Isco Modell 1750 durchgeführt; die Apparatur besteht aus einer Elektrophorese-Kammer (18 x 12 cm), die durch einen starren Trennsteg in der Mitte und durch zwei mit Dialyse-Membranen bespannte Plastikgitter in vier gleich große Kompartimente unterteilt wird. In die Kompartimente A, B, C und D, von der Kathode an gerechnet, wurden folgende Puffer gegeben:

A : 10xTBE (0.89 M Tris, 0.89 M Borsäure, 25 mM EDTA pH 8.3),
0.05 % SDS

B : 2xTBE, 0.05 % SDS

C und D : 1xTBE, 3 M Na-Acetat,

Ein kleiner Plastikbehälter (5 x 2 cm), der eine größere Vertiefung für das Gelstück und über einen Steg verbunden eine kleine Vertiefung für das Eluat enthält (beide Vertiefungen werden unten durch Dialysemembranen verschlossen), wurde über die mittlere Trennwand der Elektrophoresekammer gesteckt, das Gelstück auf der Kathodenseite in die entsprechende Vertiefung gegeben, der Plastikbehälter mit 0.1xTBE, 0.05 % SDS soweit gefüllt, daß beide Vertiefungen über den Steg mit Flüssigkeit verbunden waren und eine Leistung von konstant 3 W angelegt. Während des Laufs wurde gekühlt, indem Eiswasser über eine dafür vorgesehene Öffnung an der Seite der Elektrophoresekammer durch die hohle Trennwand gepumpt wurde. Nach 2 h wurde die Spannung für 5 min ungepolt, damit eventuell an die Dialysemembran gebundene RNA sich wieder ablöste, der Plastikbehälter aus der Kammer genommen und der Puffer soweit abgesaugt, daß nur in der kleinen, für das Eluat gedachten Vertiefung, Flüssigkeit blieb. Die eluierte RNA wurde dann mit einer Pasteurpipette entfernt, 0.3 M an Na-Acetat gemacht und bei -70°C mit 2 Vol Äthanol gefällt.

28. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* (59)

Als Vorkultur wurden 5 ml Vollmedium (YEP/FS) mit einem Klon des zu transformierenden Hefestammes beimpft und 24 - 36 h auf einer Rolltrommel bei 30°C inkubiert. Mit einer durch Vorversuche bestimmten Menge der Vorkultur wurden 100 ml Vollmedium angeimpft und 18 - 20 h bei 30°C unter Schütteln bis zu einer Zelldichte von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml (Klett-Photometer und/oder Zählkammer) wachsen gelassen.

Die Zellen wurden geerntet (JA-14, 6000 upm, 5 min) und in 10 ml H₂O aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugengläser überführt, in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (2500 upm, 2 min), mit 5 ml 1 M Sorbit, 25 mM EDTA, 50 mM Mercaptoäthanol pH 8.0 gewaschen, im gleichen Puffer aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (2500 upm, 2 min), zweimal in je 10 ml 1 M Sorbit gewaschen und in 10 ml 1 M Sorbit, 0.1 M Ca-Citrat, 10 mM EDTA pH 5.8 suspendiert. Von dieser Suspension wurden je dreimal 0.1 ml einer 10^{-4} und 10^{-5} Verdünnung auf Vollmedium-Agar ausplattiert. Der Zellsuspension wurden 0.1 ml Zymolyase (10 mg/ml) zugegeben und bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Das Fortschreiten der Sphäroplastierung wurde durch Mischen eines Tropfens der Zellsuspension mit einem Tropfen 2 % SDS auf einem Objektträger mikroskopisch verfolgt und bei >90 % Sphäroplasten von einer 10^{-2} und einer 10^{-3} Verdünnung je dreimal 0.1 ml auf Vollmedium zur Bestimmung des Anteils nicht sphäroplastierter Zellen ausplattiert.

Die Sphäroplasten wurden nun in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (2500 upm, 2 min), dreimal mit je 10 ml 1 M Sorbit, einmal mit 10 ml 1 M Sorbit, 10 mM CaCl_2 gewaschen und in 0.6 ml 1 M Sorbit, 10 mM CaCl_2 aufgenommen. Von 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} Verdünnungen der Sphäroplasten in 1 M Sorbit wurden je 0.1 ml in 8 ml Regenerations-Top-Agar (s.o. Medien) eingegossen (Bestimmung der Regenerationsfähigkeit). Die Sphäroplastensuspension wurde in 0.1 ml Portionen in Eppendorf-Hütchen verteilt, je 20 Microgramm (max. 20 Microliter) DNA und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur 1 ml 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris, 20 % PEG 4000 pH 7.4 zugegeben. Nach weiteren 20 min bei Raumtemperatur wurden die Sphäroplasten abzentrifugiert, in 0.15 ml 1 M Sorbit, 6.5 mM CaCl_2 , 33 % Vollmedium (YEP/FS) aufgenommen, 20 min bei 30°C inkubiert und zusammen mit je 8 ml Top-Agar auf selektive Regenerationsplatten gegossen. Nach Festwerden des Agars wurden die Platten im Brutschrank bei 30°C bis zum Auftreten von Kolonien (ca. 3 Tage) inkubiert.

29. Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe (60)

Transformanten von *S. cerevisiae* wurden in Reagenzgläsern in 5 ml YEP >20 h auf einer Rolltrommel angezüchtet, in einer Tischzentrifuge geerntet und in 0.5 ml SCE (1 M Sorbit, 0.1 M Na-Citrat, 0.06 M EDTA pH 7.0) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Hütchen transferiert, 8 Microliter Mercaptoäthanol und 50 Microliter Zymolyase 60 000 (1 mg/ml in SCE-Puffer) zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Sphäroplastierung wurde mikroskopisch überprüft, indem ein Tropfen der Zellsuspension mit einem Tropfen 2 % SDS auf einem Objektträger gemischt wurde und unter dem Mikroskop das Verhältnis von 'Ghosts' zu intakten Zellen bestimmt wurde. Bei >90 % Sphäroplastierung wurde 10 sek zentrifugiert, das Zellsediment in 0.5 ml 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0 resuspendiert und nach Zugabe von 0.1 ml Proteinase K (1 mg/ml in 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0) und 0.05 ml 20 % SDS 3 - 4 h bei 37°C und anschließend 20 min bei 60°C inkubiert.

Das Lysat wurde dann mit 1 Vol PCI (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 49:49:1) extrahiert, nach Trennung der Phasen (20 sek Zentrifugation) die wäßrige Phase mit 2 Vol -20°C kaltem Äthanol versetzt und nach kurzem Mischen die ausgefällten Nukleinsäuren abzentrifugiert (5 min). Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet, in 0.5 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) gelöst, 2 Microliter RNase A (10 mg/ml in 50 mM Na-Acetat pH 4.8, durch 5 min Kochen und Abschrecken auf Eis zur Inaktivierung von DNase Aktivität vorbehandelt) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde mit 1 Vol CI (Chloroform : Isoamylalkohol 24:1) ausgeschüttelt und die DNA wie oben beschrieben mit Äthanol gefällt. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet und in 50 Microlitern TE-Puffer gelöst; die so isolierte DNA reichte aus für 4 - 5 Restriktionsverdauungen und Southern-Transfers.

30. Kolonie-Hybridisierung (61)

Die Plasmid-haltigen *E. coli* Zellen wurden zu ca. 2×10^5 Klonen pro Platte auf selektivem Agar (PAA) ausplattiert und ca. 12 h bei 37°C zu kleinen Kolonien (0.1 - 0.2 mm) anwachsen gelassen. Dann wurden die Petrischalen 2 h in den Kühlschrank gegeben. Filter (Biodyne oder Nitrocellulose) wurden auf Petrischalengröße zurechtgeschnitten, markiert und beschriftet und auf die Agarplatten mit den angewachsenen *E. coli* Klonen aufgelegt. Die Filter wurden dann vorsichtig wieder abgehoben und mit den gebundenen Zellen nach oben zur Amplifizierung auf Agarplatten mit Ampicillin (20 mg/l) und Chloramphenicol (120 mg/l) gegeben. Nach 16 h bei 37°C wurden die Filter abgenommen und nacheinander auf mit verschiedenen Lösungen gesättigte Filterpapiere (Schleicher & Schuell No. 470) gelegt, und zwar 3 min : 10 % SDS, 5 min : 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, 5 min : 0.5 M Tris, 3 M NaCl pH 7.4, 5 min : 2 x SSPE; zwischen jedem Schritt wurden die Filter kurz auf trockenes Filterpapier gegeben.

Als alternative Lysismethode (62) wurden die Filter mit den *E. coli* Zellen 2 Mal 5 min auf mit 0.5 M NaOH gesättigtes Filterpapier, 2 Mal 5 min mit 1 M Tris pH 8.0, 1 Mal 5 min mit 1 M Tris, 1.5 M NaCl pH 8.0 gelegt. Anschließend wurden die so lysierten Zellen durch 2 h Backen bei 80°C im Vakuum fixiert und wie oben beschrieben hybridisiert.

31. Klonierung in M13 Vektoren (63)

In die M13-Vektoren mp8, mp10 oder mp11 (Abb.30) wurden Restriktionsfragmente wie oben beschrieben ligiert. Das Ligationsgemisch wurde anschließend in den F'-Plasmid tragenden *E. coli* Stamm 71-18 transformiert.

Zellen von 71-18 wurden auf Glucose/Minimal-Platten (s. Medien) ausgestrichen und über Nacht bei 36°C anwachsen gelassen. Als Vorkultur wurden 2 ml 2xTY mit einer Einzelkolonie beimpft und >8 h bei 37°C auf einer Rolltrommel inkubiert. 50 ml 2xTY wurden mit 0.5 ml der Vorkultur angeimpft, bei 37°C bis zur logarithmischen Phase (3 - 4 h) geschüttelt, die Zellen geerntet (JA-20, 8000 upm, 5 min) und in 1/2 Vol kaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Mit 1 ml der Kultur waren vor dem Ernten erneut 20 ml 2xTY angeimpft worden um später frische Zellen zur Verfügung zu haben. Nach 20 min auf Eis wurden die Zellen wie oben abzentrifugiert und in 1/10 Vol (5 ml) 50 mM CaCl₂ aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde zu Portionen von je 0.3 ml in Eppendorf-Hütchen verteilt, die transformierenden DNAs zugegeben, 40 min auf Eis inkubiert, 3 min auf 42°C erhitzt und dann die Gefäße wieder auf Eis gegeben. Pro Transformationsansatz wurden 20 Microliter 0.1 M IPTG, 20 Microliter X-Gal (2 % in Dimethylformamid) und 0.2 ml frische *E. coli* 71-18 Zellen gemischt, 0.23 ml dieses Gemisches den transformierten Zellen zugesetzt, je 3 ml H Top-Agar (nach dem Autoklavieren bei 42°C flüssig gehalten) zugegeben und nach Durchmischen auf H Platten gegossen. Die Platten wurden, nachdem der Agar fest geworden war, bei 37°C bis zum Erscheinen von deutlich sichtbaren Plaques in den Brutschrank gegeben.

32. Isolierung von einzelsträngiger Phagen DNA (M13-System) (64)

Eine Vorkultur des *E. coli* Stammes 71-18 wurde mit 2xTY 1:100 verdünnt und je 1.5 ml in sterile Reagenzgläser verteilt. Diese wurden mit je einem Plaque der Transformantenplatten beimpft (weiße Plaques für Vektoren + Insert, blaue Plaques für Vektoren) und bei 37°C 5 h auf eine Rolltrommel gegeben. Dann wurde die Zellsuspension in ein Eppendorf-Hütchen gegeben, 15 sek zentrifugiert, der Überstand abgehoben und der Niederschlag getrocknet. Aus dem Zellniederschlag wurde die doppelsträngige, replikative Form der Phagen-DNA nach der oben beschriebenen Mini-Screen Methode isoliert.

Der Überstand, der die Phagen enthielt, wurde erneut 5 min zentrifugiert, der klare Überstand abgegossen, 0.2 ml 20 % PEG 6000, 2.5 M NaCl zugegeben und nach Mischen 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Phagen wurden abzentrifugiert (5 min), der PEG-haltige Überstand sorgfältig entfernt, die Phagen in 0.1 ml 0.3 M Na-Acetat, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 und 0.05 ml 0.3 M Na-Acetat gesättigtem Phenol gut suspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem gründlichen Mischen wurde 3 min zentrifugiert, die wäßrige Phase abgehoben, mit 1 ml Äthanol versetzt und bei -70°C eingefroren. Nach >5 h wurde die ausgefällte DNA abzentrifugiert (10 min), der Niederschlag mit 66 %-igem Äthanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20 Microlitern TE gelöst. 2 Microliter der erhaltenen DNAs wurden in einem Tris Acetat-Gel (s.o.) elektrophoresiert und das Vorhandensein inserierter DNAs durch Vergleich mit Vektor DNA bestimmt (vgl. Abb. 32).

33. Isolierung von doppelsträngiger Phagen DNA (replikative Form) (64)

Für kleine Präparationen wurde der bei der Isolierung der einzelsträngigen DNA anfallende Zellniederschlag nach der Mini-Screen Methode aufgearbeitet. Zur Isolierung größerer Mengen doppelsträngiger Phagen DNA wurde wie folgt verfahren:

0.5 l 1xTY wurden mit 1 ml einer Übernacht-Vorkultur von *E. coli* 71-18 beimpft und 3 h bei 36°C bis zu einer Zelldichte von 60 - 70 Kletteinheiten geschüttelt. Dann wurden 1.5 ml einer wie oben isolierten Phagen-Suspension zugegeben und weiter 6 h bei 36°C geschüttelt. Die Zellen wurden geerntet (8000 upm, 10 min, 4°C) und der Phagen-haltige Überstand gegebenenfalls zur Isolierung der einzelsträngigen DNA aufbewahrt. Aus den Zellen wurde die doppelsträngige DNA (replikative Form des Phagen) nach der oben (s. S.15) beschriebenen Methode der Plasmid-Isolierung gewonnen.

34. DNA-Sequenzierung nach der Dideoxynukleotid Terminations-Methode (65)

Eine thermostatisierbare Elektrophorese-Platte wurde mit Repel-Cote (66) und eine entsprechende Glasplatte mit Bind-Silane (25 Microliter Bind-Silane, 8.3 ml Äthanol, 0.25 ml 10 % Essigsäure) vorbehandelt. 21.5 g Harnstoff wurden in 15 ml H₂O, 5 ml 10xTBE und 7.5 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid, 1/20 N,N'-Methylen Bisacrylamid) bei 60°C gelöst, auf 50 ml mit H₂O aufgefüllt, filtriert und entgast. Nach Zugabe von 0.15 ml 10 % Ammoniumpersulfat und 0.05 ml TEMED wurde ein Sequenziergel (LKB Macrophor-System, 53 x 18 cm, 0.1 mm Spacer) gegossen und >1 h polymerisieren gelassen. Anschließend wurde das Gel mit 10 mA unter Thermostatisierung bei 56°C vorelektrophoresiert.

Im weiteren Versuchsverlauf wurden folgende Lösungen verwendet:

Klenow-Puffer: 0.1 M Tris, 0.1 M MgCl₂ pH 8.5;

A-Mix: 20 Microliter 0.5 mM dCTP, 20 Microliter 0.5 mM dGTP, 20 Microliter 0.5 mM dTTP, 20 Microliter TE-Puffer, 80 Microliter 0.1 mM ddATP;

C-Mix: 1 Microliter 0.5 mM dCTP, 20 Microliter 0.5 mM dGTP, 20 Microliter 0.5 mM dTTP, 20 Microliter TE, 80 Microliter 0.1 mM ddCTP;

G-Mix: 20 Microliter 0.5 mM dCTP, 1 Microliter 0.5 mM dGTP, 20 Microliter 0.5 mM dTTP, 20 Microliter TE, 80 Microliter 0.3 mM ddGTP;

T-Mix: 20 Microliter 0.5 mM dCTP, 20 Microliter 0.5 mM dGTP, 1 Microliter 0.5 mM dTTP, 20 Microliter TE, 80 Microliter 0.5 mM ddTTP;

das Verhältnis von Monodeoxynukleotiden zu Dideoxynukleotiden kann bei Bedarf, z.B. um länger lesbare Sequenzen zu erhalten, verändert werden.

Chase-Lösung: 0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dGTP, 0.5 mM dTTP;

Farbmix: 20 mM EDTA, 0.1 % Bromphenolblau, 0.1 % Xylencyanol in deionisiertem Formamid.

1 Microliter des 17meren universellen M13-Primers (GTAAACGACGGCCAGT) (67), 1 Microgramm der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA (1 - 5 Microliter), 1.5 Microliter Klenow-Puffer und H₂O ad 10 Microliter wurden in einem Eppendorf-Hütchen gemischt und in einem Brutschrank bei 57°C 2 h inkubiert. Wenn das Primer/Template Gemisch nicht gleich zur Sequenzierung benutzt wurde, wurde es bei -20°C eingefroren.

Zum Primer/Template Gemisch wurden 1 Microliter alpha-³²P dATP (10 Microcurie, 400 Ci/mmol) und 0.5 Microliter Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (1.5 U) gegeben, gemischt und je 2.5 Microliter dieses Gemisches auf 4 kleine Eppendorf-Hütchen verteilt. Zu je einem Aliquot wurden 2 Microliter A-Mix, C-Mix, G-Mix und T-Mix gegeben und 15 min bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Dann wurden je 2 Microliter Chase-Lösung zugegeben, weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, je 1 Microliter 0.2 M EDTA pH 8.0 zum Stoppen zugesetzt, die Proben unter Ölpumpen-Vakuum (Speed Vac) einrotiert und in je 3 Microlitern Farbmix gelöst. Die DNAs wurden durch 5 min Kochen denaturiert, je 1.5 Microliter auf das Gel aufgetragen und bei 15 mA elektrophoresiert. Die anderen 1.5 Microliter wurden kalt gestellt und für einen zweiten, kürzeren Gellauf benutzt. Das eine Gel wurde soweit laufen gelassen, bis Xylencyanol, das andere bis Bromphenolblau am Gelende angelangt war. Die Gele wurden 15 min in 10 % Eisessig fixiert, 1 h bei 80°C getrocknet und nach Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak XAR-5) 8 - 36 h bei Raumtemperatur exponiert.

35. Ultraschall-Lyse von *E. coli* Zellen

E. coli Zellen wurden auf Penassay-Agar ausgestrichen und bei 37°C ca. 24 h wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann mit einem sterilen Zahnstocher abgekratzt und in einem Eppendorf-Hütchen in 0.3 ml 0.14 M NaCl, 0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0 suspendiert. Nach Einfrieren der Zellsuspension bei -20°C und Auftauen wurden 45 Microliter 20 % SDS zugegeben, gemischt und die Zellen unter Eiskühlung 9 min mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier B-12, Stufe 2). Das Lysat wurde 5 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert, 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge die Zelltrümmer entfernt und nach einer Proteinbestimmung des klaren Lysats (gewöhnlich 15 - 25 mg/ml) bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren.

36. Transfer von Proteinen aus Acrylamid-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen ('Western-Transfer') (68)

In einer Plastikwanne wurde der Transfer folgendermaßen aufgebaut: auf Gummifüße (Höhe 2.5 cm) wurde eine perforierte Stahlplatte (16 x 21 cm) als Kathode, 6 auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere (Schleicher & Schuell, No. 470) mit 0.5 % SDS getränkt, das Proteingel, ein Nitrocellulose-Filter, 15 in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % Methanol pH 8.3) getränkte Filterpapiere, eine perforierte Stahlplatte als Anode, weitere 5 mit Transferpuffer getränkte Filter, eine Glasplatte und ein Gewicht (1 kg) gegeben. Der Transferpuffer wurde soweit eingefüllt, bis die untere Stahlplatte (Kathode) benetzt war. Dann wurde Strom von 250 mA angelegt und die Spannung nachreguliert bis 60 V erreicht waren. Der Transfer wurde bei 60 V bis zu insgesamt 2.5 h fortgesetzt.

Anschließend wurde der Filter mit den gebundenen Proteinen abgenommen, durch 2 h Inkubieren mit 8 % Rinderserumalbumin in PBS-Puffer (0.14 M NaCl, 0.1 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0) bei 42°C abgesättigt und 24 - 48 h mit 5×10^6 cpm jodierten Antikörpern in der gleichen Lösung bei 42°C inkubiert.

Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch 4 h Waschen mit 4 x 200 ml PBS-Puffer, 1 % Triton X-100 bei 42°C entfernt, die Filter getrocknet und bei -70°C autoradiographiert.

37. Entfernung von *E. coli* spezifischen Antikörpern aus Kaninchen- bzw. Schaf-Antisera (69)

Ein *E. coli* Klon, der nur das Vektor-Plasmid ohne inserierte Hefe-DNA enthielt (pMS 201), wurde 16 h bei 37°C in 30 ml Ampicillin-haltigem BHI-Medium anwachsen gelassen, die Zellen durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min) geerntet und in 0.1 M Na_2CO_3 (Kopplungspuffer) mit Ultraschall (s.o.) aufgeschlossen. Das Lysat wurde 16 h bei 4°C gegen 2 l Kopplungspuffer dialysiert.

1.5 g BrCN-aktivierte Sepharose 4B wurde 1 h bei Raumtemperatur in 1 mM HCl quellen gelassen, dann auf einer Glasfritte mit 400 ml 1 mM HCl gewaschen und zur Kopplung mit 0.9 ml Lysat (7.5 mg) in 10 ml Kopplungspuffer 2 h bei Raumtemperatur auf einer Rolltrommel inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen und zur Absättigung restlicher aktiver Gruppen in 10 ml 1 M Äthanolamin pH 8.0 2 h bei Raumtemperatur auf einer Rolltrommel gegeben. Schließlich wurde das Gel dreimal abwechselnd mit je 100 ml 0.1 M Na-Acetat, 1 M NaCl pH 4.0 und 100 ml 0.1 M Borat-Puffer, 1 M NaCl pH 8.0 gewaschen, in eine 5 ml Spritze als Säule gefüllt und mit PBS-Puffer äquilibriert.

Auf diese Säule wurden 2 ml ^{125}J markierte Fettsäuresynthetase-Antiserum vom Schaf (4×10^7 cpm) aufgetragen und mit 7 ml 1 % Rinder Serumalbumin in PBS-Puffer alle nicht ans *E. coli* Lysat bindenden Antikörper eluiert. So gereinigte Antisera unterschieden besser zwischen FAS-positiven und FAS-negativen *E. coli* Klonen.

38. Markierung von Proteinen mit ^{125}J (70)

Eine Sephadex G-25 Säule (9 ml) wurde mit 70 mM Barbitat-Puffer pH 8.6 äquilibriert. Dann wurden 60 mg Rinder Serumalbumin in 0.5 ml Barbitatpuffer auf die Säule gegeben und mit 20 ml Barbitatpuffer gewaschen.

In einem Eppendorf-Hütchen wurden 5 Microliter Na^{125}J (500 mCi), 10 Microliter 0.5 M Na-Phosphatpuffer pH 7.5, 0.1 mg affinitätschromatographisch gereinigte Fettsäuresynthetase-Antikörper (vom Schaf oder Kaninchen), 10 Microliter Chloramin T (N-Chloro-p-toluol-sulfonamid, 4 mg/ml in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.5) gemischt und 3 min bei Raumtemperatur belassen. Chloramin T oxidiert J^- zu J-Cl , welches dann elektrophil ein Proton am Tyrosin-Ring des Proteins substituiert (71).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.86 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (314 mg/ml in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.5) gestoppt, dann wurden 0.1 ml KJ (1 mg/ml in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.5) als Träger zugesetzt und der Ansatz auf die äquilibrierte Sephadex-Säule gegeben. Die Probe wurde mit Barbitatpuffer eluiert und das Eluat in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde mit einem Mini-Monitor qualitativ bestimmt (Abb.4) und die Hauptfraktionen des ersten Gipfels vereinigt. Die spezifische Radioaktivität der so markierten Antikörper lag bei $2 - 6 \times 10^7$ cpm/ml bzw. $1 - 1.5 \times 10^6$ cpm/Microgramm.

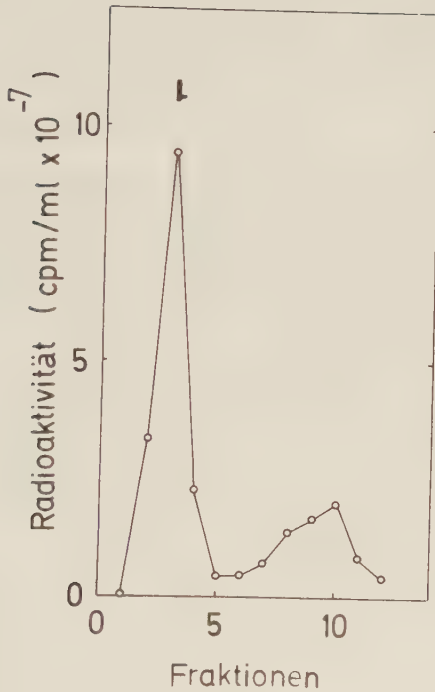


Abb. 4: Trennung von markiertem Protein und uneingebautem Jodid-125 über eine Sephadex G-25 Säule (70)

Eine Sephadex G-25 Säule ($r = 0.75$ cm, $l = 5.4$ cm) wurde mit 0.07 M Barbitol-Puffer pH 8.6 äquilibriert, ein Jodierungsansatz (1.25 ml mit 0.1 mg Protein) aufgetragen und mit 0.07 M Barbitolpuffer pH 8.6 eluiert. Fraktionen zu 1 ml wurden aufgefangen und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Fraktionen des ersten Gipfels (Pfeil), der das markierte Protein enthält, wurden vereinigt.

III. ERGEBNISSE

1. Immunologische Untersuchung von Extrakten FAS DNA-haltiger *E. coli* Klone

Vor Beginn dieser Arbeit waren von unserer Arbeitsgruppe aus einer Hefe DNA-Benbank mehrere *FAS1* wie auch *FAS2* Cosmid-Klone isoliert worden (8). Da die ursprünglich isolierten *FAS1* Klone jeweils nur einen Teil der *FAS1* DNA enthielten, war aus ihnen das Plasmid pMS 3021 konstruiert worden, welches das vollständige *FAS1* Gen enthält. Die Herstellung und Eigenschaften dieses, sowie aller anderen in dieser Arbeit isolierten *FAS1* und *FAS2* Subklone sollen erst weiter unten im einzelnen beschrieben werden (vgl. S.63 ff.).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich die Zellextrakte der oben erwähnten *FAS* Klone mit Hefe-Fettsäuresynthetase spezifischen Antikörpern nach kreuzreagierendem Material (CRM) untersucht. Durch Auftragen von Tropfen der Zellextrakte auf Nitrocellulose und anschließender Inkubation mit radioaktiv (^{125}J) markierten *FAS* Antikörpern konnte nur im *FAS2* Klon pYc 1156 eine Kreuzreaktion nachgewiesen werden (Abb.5a). Vorversuche hatten gezeigt, daß affinitätschromatographisch mittels reiner Hefe Fettsäuresynthetase angereicherte *FAS* Antikörper aus Kaninchen oder Schaf noch unspezifisch an *E. coli* Proteine bindende Komponenten enthielten. Diese unspezifischen Beimengungen waren durch Passage der Seren über eine Sepharose-Säule, an die mittels BrCN die Proteine eines *E. coli* Zellextraktes gebunden worden waren, zu einem großen Teil entfernt worden. Wie Abb.5c zeigt, war danach nur das gereinigte Schafserum völlig frei von gegen *E. coli* Proteine gerichteten Antikörpern. Im Kaninchen-Serum waren dagegen auch nach dieser Reinigung immer noch mehrere unspezifische, *E. coli* reaktive Komponenten vorhanden (Abb.5b).

In einer daran anschließenden Versuchsreihe wurden Zellextrakte der *FAS2* Klone pYc 1156 und pYc 1153, der *FAS1* Klone pYc 1153, pYc 1152, pYc 1148 und pMS 3021 sowie, als Kontrolle, des nur Vektor-DNA enthaltenden Klons pMS 201 zusammen mit Hefezellextrakt und gereinigter *FAS* in einem denaturierenden SDS-Harnstoff Gel elektrophoretisch getrennt. Die Proteinbanden wurden dann auf Nitrocellulose transferiert und mit den affinitätschromatographisch gereinigten (s.o.) und radioaktiv markierten *FAS*-Antikörpern inkubiert. Die Filter wurden gewaschen und autoradiographiert (Abb.5b, c). Die Klone pMS 3021, pYc 1152 und pYc 1153 (*FAS1*) zeigten mit Kaninchenserum partiell dasselbe Bandenmuster wie der *FAS2* Klon pYc 1156 (Abb.5b). Es ist daher wahrscheinlich, daß diese Banden auf unspezifische, im Kaninchen-Serum noch vorhandene, gegen *E. coli* Antigene gerichtete Antikörper zurückzuführen sind. Trotzdem erkennt man daneben im Extrakt des *FAS2* Klons pYc 1156 mindestens zwei spezifische, deutlich ausgeprägte Signale. Dieses offenbar *FAS*-spezifische CRM ist nicht identisch mit der intakten *FAS* alpha-Untereinheit, sondern besitzt im Vergleich zu dieser ein deutlich geringeres Molekulargewicht (Abb.5b, c). Dasselbe CRM, wenn auch mengenmäßig weniger, erkennt man auch im Extrakt des zweiten *FAS2* Klons pYc 1153 (Abb.5c).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die FAS2 DNA im Plasmid pYc 1156 - im geringen Maße auch die des Plasmids pYc 1155 - in *E. coli* zwar transkribiert und anschließend auch ein mit FAS Antikörpern reagierendes Translations-Produkt synthetisiert wird, daß dieses Protein aber nicht die intakte FAS alpha-Untereinheit darstellt. Diese wird demnach in *E. coli* entweder nicht als solche vollständig synthetisiert oder ist in der Bakterienzelle instabil. Möglicherweise brauchen die beiden FAS-Untereinheiten die Komplexierung mit der jeweils anderen Komponente zu ihrer Stabilisierung. Insbesondere scheint dies für die beta-Untereinheit zuzutreffen, welche in keinem FAS1 Klon, selbst nicht in pMS 3021, welcher das intakte FAS1 Gen enthält, immunologisch nachgewiesen werden kann (Abb.5b, c).

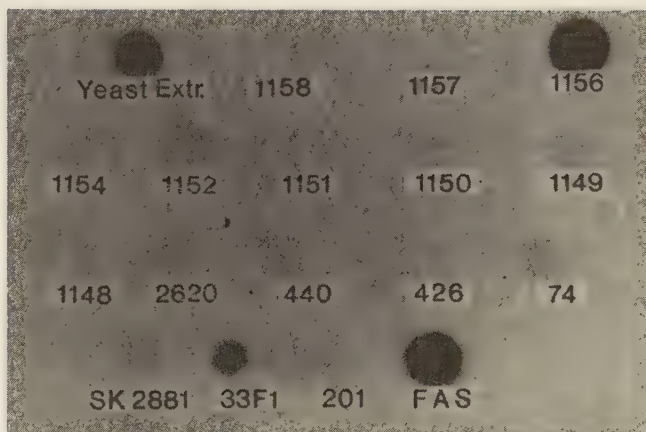


Abb.5a: Immunologische Untersuchung einiger FAS
DNA-haltiger *E. coli* Klone

Je 40 Microgramm des Ultraschall-Lysats verschiedener *E. coli* Klone, sowie als Kontrollen Lysate der Klone SK 2881 (Plasmid-frei) und pMS 201 (enthält nur den Vektor), 1.7 Microgramm gereinigte FAS und 30 Microgramm Wildtyphefe-Lysat wurden auf einen Nitrocellulose-Filter aufgetropft und mit radioaktiv markierten, vorher affinitätschromatographisch gereinigten FAS Antikörpern vom Schaf inkubiert. Nach Waschen des Filters wurde dieser bei -70°C autoradiographiert.

Experimentelle Einzelheiten siehe Material und Methoden.

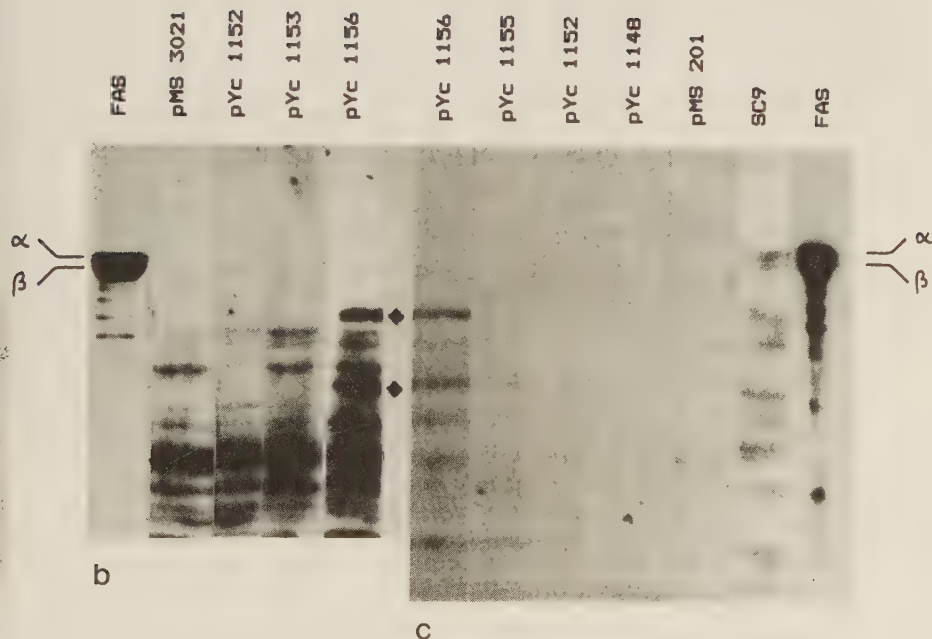


Abb. 5b,c: Immunologische Untersuchung einiger FAS
DNA-haltiger E. coli Klone

Je 0.5 mg Ultraschall-Lysate verschiedener FAS Klone, des Vektor-haltigen Klons pMS 201, 0.2 mg Wildtyphefe-Extrakt (SC9) sowie 5 Microgramm gereinigte FAS wurden auf ein denaturierendes SDS/Harnstoff-Gel aufgetragen, die Proteinbanden bei 20 V aufgetrennt und diese dann durch 'Elektro-Blot' auf Nitrocellulose übertragen. Das gezeigte Bandenmuster ergab sich nach Inkubation mit ^{125}I markierten und affinitätschromatographisch (s. Material und Methoden) bereits von einem Teil der E. coli spezifischen Komponenten befreiten FAS Antikörpern.

In (b) wurde Kaninchen-Antiserum und in (c) Schaf-Antiserum verwendet.

FAS-spezifische Banden in den E. coli Extrakten sind markiert (◆), ebenso wie die FAS-Untereinheiten beim gereinigten Enzym und in Hefe-Zellextrakt.

2. Untersuchung der chromosomalen Kontinuität der ursprünglichen, aus einer Cosmid-Genbank isolierten FAS1 Klone

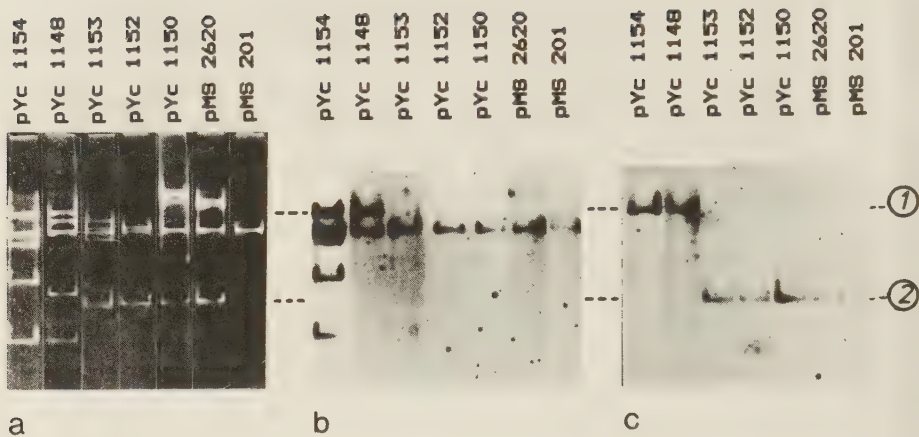
Die von M. Schweizer und C. Lebert isolierten Cosmid-Klone pMS 2620, pYc 1150, pYc 1152, pYc 1153 einerseits und pYc 1148 und pYc 1154 andererseits enthalten *FAS1* DNA-Sequenzen verteilt auf zwei verschiedene *Bam*HI Fragmente (vgl. Abb.6d). Beide hybridisieren mit dem *Hind*III Fragment #2 des von J. Carbon erhaltenen *FAS1* Klons 33F1 (Abb.6c). Weiterhin war unter Verwendung geeigneter Hybridisierungsproben gezeigt worden, daß die beiden *Bam*HI Fragmente pYc 1154 *Bam*HI #1 und pYc 1152 *Bam*HI #3 sehr wahrscheinlich auf dem Genom in der in Abb.6d gezeigten Weise zueinander angeordnet sind. Daß beide *Bam*-Fragmente direkt benachbart sind, war allerdings noch zu beweisen.

In diesem Zusammenhang war vor Beginn dieser Arbeit durch Fusion des pYc 1152 *Bam*HI #3 Fragments mit einem aus Abb.6d ersichtlichen pYc 1154 *Bam*HI/*Eco*RI Fragment der neue Klon pMS 3021 konstruiert worden (8). Um die Frage der chromosomalen Kontinuität der *Bam*HI-Fragmente pYc 1154 *Bam*HI #1 und pYc 1152 *Bam*HI #3 (vgl. Abb.6d) zu klären, galt es zu zeigen, daß pMS 3021 über die interne *Bam*HI Schnittstelle hinweg kontinuierliche *FAS1* DNA, entsprechend der chromosomalen DNA im Hefe-Genom, enthält. Außerdem war zu prüfen, ob die weiteren in den *FAS1* Klonen pMS 2620, pYc 1152, pYc 1153, pYc 1148 und pYc 1154 enthaltenen *Bam*HI Fragmente an das *FAS1* Gen angrenzende oder damit nicht in Zusammenhang stehende DNA-Abschnitte repräsentieren.

Dazu wurden im sog. 'genomic blotting' Verfahren verschiedene *FAS1* Plasmide einerseits und chromosomale Hefe-DNA andererseits mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und die Spaltmuster mit den in Abb.7e gezeigten DNA-Proben hybridisiert. Wie aus Abb.7a-d ersichtlich ist, hybridisieren die Proben b und c bei pMS 3021 und genomischer Hefe-DNA mit demselben *Hind*III-Fragment, d.h. das bei pMS 3021 durch Fusion ursprünglich getrennt klonierter DNA-Fragmente entstandene *Hind*III-Fragment ist identisch mit einem entsprechenden *Hind*III-Fragment aus genomischer DNA. Demgegenüber hybridisiert Probe a bei pYc 1152 und pYc 1153 zwar mit dem gleichen *Hind*III Fragment, dieses ist aber verschieden von dem mit Probe a hybridisierenden pMS 2620 Fragment und alle sind sie verschieden von dem in chromosomaler Hefe-DNA hybridisierenden *Hind*III-Fragment. Wie zu erwarten, waren die mit Probe a hybridisierenden *Bam*HI Fragmente der Klone pYc 1152, pYc 1153 und pMS 2620 und der chromosomalen Hefe DNA identisch. Entsprechendes gilt für Probe d und die Plasmide pYc 1148 und pYc 1154. Auch hier sind die hybridisierenden *Bam*HI-Fragmente der Klone und der Hefe DNA identisch. Die *Eco*RI-Fragmente aber sind sowohl untereinander wie auch im Vergleich zu dem aus chromosomaler DNA stammenden *Eco*RI-Fragment verschieden. Das zweite *Bam*HI Fragment der Klone pYc 1148 und pYc 1154 hybridisiert deswegen mit Probe d, weil diese auch ein Stück Vektor DNA enthält (vgl. Abb.7f).

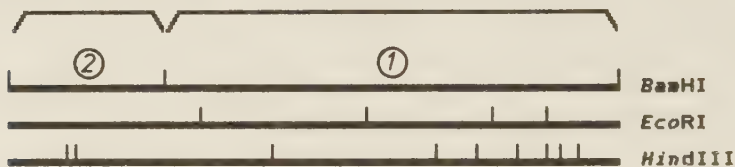
Die verschiedenen untersuchten Klone enthalten demnach außer den zwei *FAS1*-haltigen *Bam*HI-Fragmenten keine weiteren im Genom nach der einen oder anderen Seite direkt an *FAS1* angrenzenden DNA-Fragmente. Daraus muß man schließen, daß die untersuchten Cosmide sich wahrscheinlich aus willkürlich miteinander ligierten *Bam*HI-Fragmenten der Hefe-DNA und nicht aus partiell verdauten, noch ungespalten gebliebene *Bam*HI Schnittstellen enthaltenden, größeren DNA-Stücken zusammensetzen.

Es ist nach diesen Versuchen aber klar, daß die in dem Klon pMS 3021 subklonierten Sequenzen eine kontinuierliche, auch im Genom in dieser Anordnung vorliegende DNA-Region darstellen. Insgesamt standen uns damit 14,8 kb zusammenhängender, das *FAS1* Gen beinhaltender chromosomaler Hefe-DNA in klonierter Form zur Verfügung. Durch Isolierung des Klons pMS 8156 aus einer zusätzlichen, *HindIII*-Fragmente enthaltenden Hefe-DNA Genbank durch Kolonie-Hybridisierung mit der Probe a (vgl. Abb.7b) konnte diese Region um weitere 2.2 kb auf insgesamt 17 kb ausgedehnt werden (M. Schweizer und G. Lebert) (72).



pYC 1153 *Bst*XI #5
 pYC 1152 *Bst*XI #3
 pYC 1150 *Bst*XI #5
 pMS 2620 *Bst*XI #3

pYC 1154 *Bst*XI #1
 pYC 1148 *Bst*XI #1



33F1 *Hind*III #2

pMS 3021 *Bst*XI/*Eco*RI #2, #3, #5

1 kb

d

Abb.6: Vergleichende Southern-Hybridisierung und Restriktionskartierung der ersten, in diesem Institut isolierten FAS1 Cosmid-Klone
 (nach M. Schweizer und C. Lebert)

*Bst*XI Restriktionsmuster (a) und Southern-Hybridisierung derselben mit pYC 1154 (b) bzw. 33F1 *Hind*III #2 (c); (d) enthält die beiden mit 33F1 *Hind*III #2 überlappenden, in den sechs Klonen gemeinsam enthaltenen *Bst*XI-Fragmente <1> und <2> in vorläufig hypothetischer chromosomaler Juxtaposition. Ebenfalls in (d) ist die *Eco*RI und *Hind*III Restriktionskarte dieser DNA-Region gezeigt (nach M. Schweizer).

Die Nummerierung von Restriktionsfragmenten erfolgte hier und in allen künftigen Abbildungen so, daß das größte Fragment mit #1 bezeichnet wurde und die weiteren Fragmente mit abnehmender Größe durchnummeriert wurden.

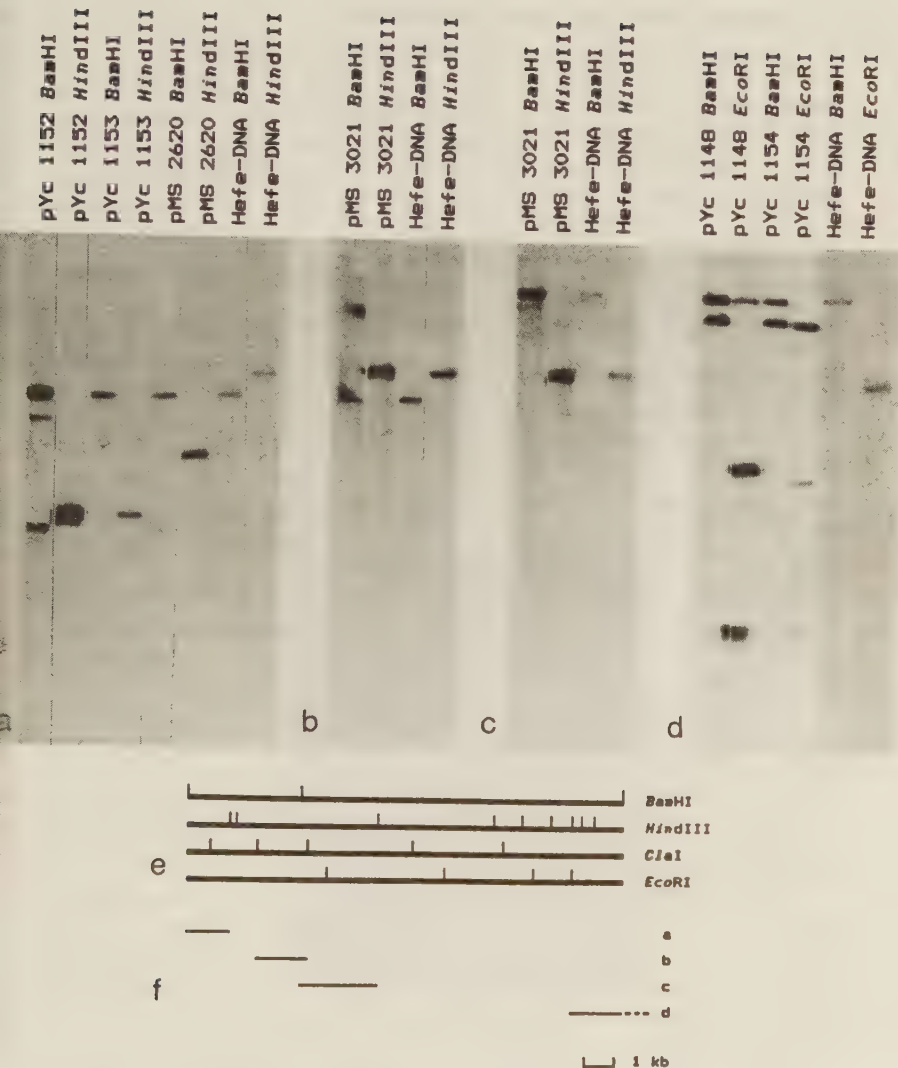


Abb.7: Untersuchung der genomischen Kontinuität einiger klonierter FAS1 Plasmide

Es wurden je 1 Microgramm Plasmid-DNA und 20 Microgramm Wildtyphefe-DNA wie angegeben verdaut und die elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente nach Southern-Transfer auf Nitrocellulose in (a) - (d) mit den in (f) gezeigten, radioaktiv markierten Proben hybridisiert. Probe d enthält zusätzlich ein Stück Vektor-DNA. In (e) sind die verschiedenen klonierten FAS1-haltigen BsaHI-Fragmente und die Restriktionskarte der betreffenden Region gezeigt.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

3. Restriktionskartierung der FAS1 Region

Die *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III Schnittstellen innerhalb der 14.8 kb langen klonierten, das *FAS1* Gen enthaltenden DNA Region waren bereits von M. Schweizer kartiert worden (vgl. Abb.6d). Meine Aufgabe war es, für eine Reihe weiterer Restriktionsenzyme die Lage der Schnittstellen zu bestimmen. Wie Transformations-Experimente von L. Roberts zwischenzeitlich ergeben hatten, repräsentiert der neu konstruierte Subklon pMS 3021, obwohl er nur einen Teil der insgesamt klonierten DNA enthält (8.7 kb; vgl. Abb.6d), das vollständige *FAS1* Gen (73). Daher beschränkten sich die im folgenden beschriebenen Kartierungs-Versuche nur auf die in pMS 3021 enthaltene DNA-Region. Die Restriktionskartierung erfolgte durch Anwendung dreier sich ergänzender Methoden:

- 1) Die Lage der Restriktionsschnittstellen und die Größe der entstehenden Restriktionsfragmente im Plasmid pMS 3021 wurde durch Einzel-, Doppel- oder Dreifachspaltungen untersucht (Abb.8, 9). Die Länge der Fragmente wurde durch Vergleich mit parallel im Gel laufenden Größen-Standards (Tab.1) ermittelt.

- 2) Durch Subklonierung (s.u.) einzelner Restriktionsfragmente und Restriktionsanalyse der neuen, kleineren Plasmide wurden die Schnittstellen einiger Enzyme exakter als unter (1) bestimmt. Dies war vor allem bei sehr häufig in pMS 3021 schneidenden Restriktionsenzymen (z.B. *Hinc*II) von Vorteil (Abb.9 - 13). Die hierzu verwendeten Subklone sind in Tab.4 aufgeführt, die in ihnen enthaltenen *FAS1* Fragmente sind in Abb.23 gezeigt.

- 3) Waren die Schnittstellen mancher Enzyme durch die beiden obigen Methoden noch nicht eindeutig definiert, so wurden Restriktionsfragmente von pMS 3021 aus Agarose-Gelen eluiert, ohne vorherige Subklonierung direkt mit zusätzlichen Restriktionsendonukleasen nachgespalten und die Spaltprodukte analysiert (Abb.14).

Zur Überprüfung der so erstellten Restriktionskarte und gleichzeitig zur Überprüfung der nach der Restriktionskarte konstruierten Subklone wurden Restriktionsmuster von pMS 3021 und verschiedener Subklone nach der Southern-Methode auf Nitrocellulose transferiert und mit isolierten Restriktionsfragmenten von pMS 3021 oder mit Subklon-Plasmid DNA hybridisiert. Diese Hybridisierungen bestätigten die erstellte Restriktionskarte. Ein repräsentatives derartiges Experiment ist in Abb.9 gezeigt.

Die zusammengefaßten Daten aus den verschiedenen Restriktionsanalysen sind in der Restriktionskarte von pMS 3021 (Abb.15) enthalten. Die Positionen der Restriktionsschnittstellen waren nach den obigen Methoden, je nach Enzym, auf 20 - 50 bp genau (ca. 95% Genauigkeit) bestimmt worden. Durch die inzwischen weitgehend abgeschlossene Sequenzierung von pMS 3021 (s.u.) wurde die Richtigkeit der so erstellten Restriktionskarte bestätigt. Nur für das Enzym *Hinc*II, welches pMS 3021 dreizehnmal schneidet, war die Korrektur einer Schnittstelle (umgekehrte Reihenfolge zweier Fragmente) nötig.

Die Positionen der verschiedenen Restriktionsschnittstellen sind in Tab.2 aufgeführt, wobei als Koordinate 0 die *Eco*RI Schnittstelle am linken Ende der Restriktionskarte festgelegt wurde. Für deren Genauigkeit gilt, solange noch unsequenzierte Teilbereiche der DNA vorhanden sind, das oben gesagte. Für alle Restriktionsfragmente ist ihre durch Restriktionskartierung erhaltene Größe in Tab.3 angegeben. In den Fällen, bei denen inzwischen die genaue Fragmentlänge durch DNA-Sequenzierung bekannt ist, sind diese Werte ebenfalls in Tab.3 angegeben.

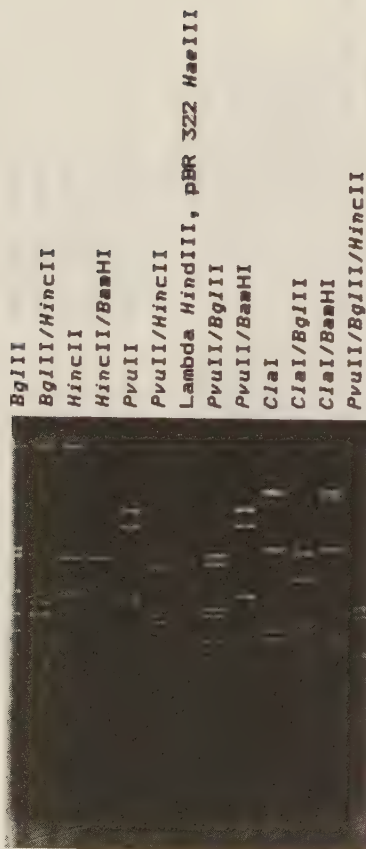


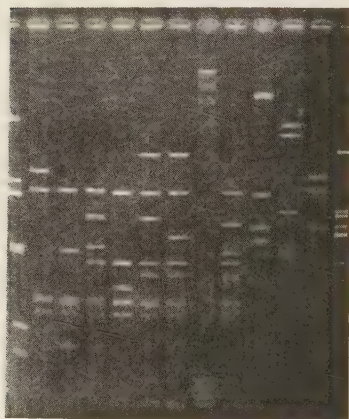
Abb.8: Verschiedene Einfach- oder Mehrfach-
Restriktionsspaltungen von pMS 3021

Je 2 Microgramm Plasmid-DNA des Klons pMS 3021 wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, die Restriktionsfragmente in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidium-Bromid angefärbt und unter UV-Beleuchtung photographiert.

Größen-Standard: Lambda-DNA, HindIII/pBR 322, HaeIII-gespalten.

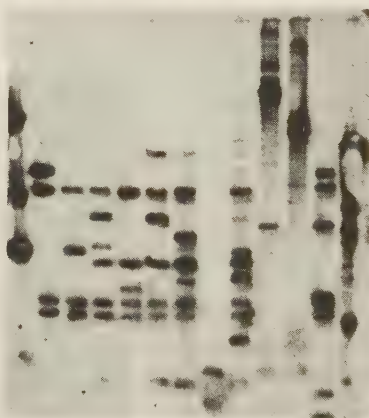
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

pMS 3021 *PvuII*/*EcoRI*
 pMS 3010 *HincII*
 pMS 3022 *HincII*
 pMS 2599 *HincII*
 pMS 201 *HincII*
 pMS 3021 *HincII*
 pMS 3021 *HincII*/*BamHI*
 Lambda *HindIII*, pBR 322 *HaeIII*
 pMS 3021 *HincII*/*ClaI*
 pMS 3021 *ClaI*/*HindIII*
 pMS 3021 *ClaI*/*PvuII*
 pMS 3021 *HincII*/*HindIII*
 pMS 3021 *BglII*/*BamHI*



a

pMS 3021 *PvuII*/*EcoRI*
 pMS 3010 *HincII*
 pMS 3022 *HincII*
 pMS 2599 *HincII*
 pMS 201 *HincII*
 pMS 3021 *HincII*
 pMS 3021 *HincII*/*BamHI*
 Lambda *HindIII*, pBR 322 *HaeIII*
 pMS 3021 *HincII*/*ClaI*
 pMS 3021 *ClaI*/*HindIII*
 pMS 3021 *ClaI*/*PvuII*
 pMS 3021 *HincII*/*HindIII*
 pMS 3021 *BglII*/*BamHI*



b

Abb.9: Restriktionsanalyse und Southern-Hybridisierung von
pMS 3021 und verschiedener daraus abgeleiteter
Subklone zur Kartierung der *HincII* Schnittstellen

Je 2 Microgramm der verschiedenen Plasmid-DNA's wurden mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut, das Spaltgemisch elektrophoresiert und nach Anfärben mit EtBr und Photographie des Bandenmusters unter UV-Beleuchtung (a) auf Nitrocellulose transferiert. Der Nitrocellulose-Filter wurde mit der ³²p markierten Plasmid-DNA von pMS 3026 (vgl. Abb.23) hybridisiert und autoradiographiert (b). Die Lage der subklonierten *FAS1*-Fragmente ist aus Abb.23 zu entnehmen.

Längen Standards: Lambda-DNA, *HindIII*/pBR 322, *HaeIII*-gespalten.
 Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

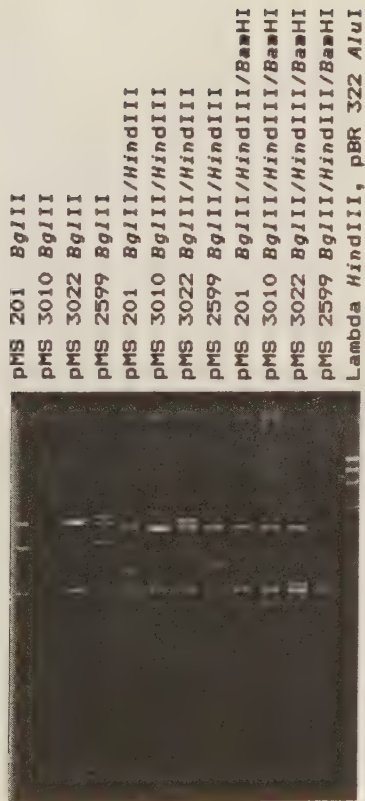


Abb.10: Restriktionsanalyse einiger FAS1 Subklone
zur Bestimmung der BglII Schnittstellen

Je 1 Microgramm der verschiedenen Plasmid-DNA's wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und die Spaltmuster nach Agarose-Gel Elektrophorese und EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Die Lage der subklonierten FAS1-Fragmente ist aus Abb.23 ersichtlich.

Längen-Standards: Lambda-DNA, HindIII/pBR 322, AluI-Spaltemisch.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

pMS 201 *HincII*
 pMS 201 *HincII/HindIII*
 pMS 201 *PvuII*
 pMS 201 *PvuII/HindIII*
 pMS 3007 *HincII*
 pMS 3007 *HincII/HindIII*
 pMS 3007 *PvuII*
 pMS 3007 *PvuII/HindIII*
 pMS 3014 *HincII*
 pMS 3014 *HincII/HindIII*
 pMS 3014 *PvuII*
 pMS 3014 *PvuII/HindIII*
 Lambda *HindIII*, pBR 322 *AluI*

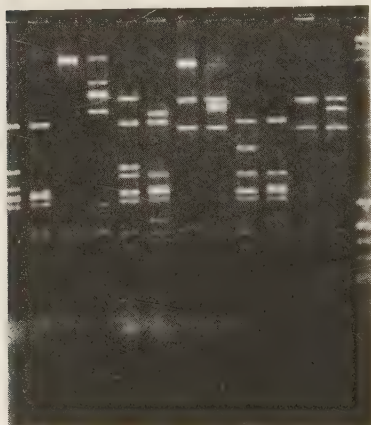


Abb.11: Restriktionsanalyse einiger FAS1 Subklone
zur Bestimmung von *HincII*
und *PvuII* Schnittstellen

Je 3 Microgramm der verschiedenen Plasmid-DNA's wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und die Spaltmuster nach Agarose-Gel Elektrophorese und EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Die Lage der subklonierten FAS1-Fragmente ist aus Abb.23 ersichtlich.

Längen-Standards: Lambda-DNA, *HindIII*/pBR 322, *AluI*-Spaltgemisch.
 Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

pMS 3014 *HincII*
 pMS 3014 *HincII/PvuII*
 pMS 3014 *PvuII*
 pMS 3014 *PvuII/BglII*
 pMS 3014 *BglII*
 pMS 3014 *BglII/HincII*
 pMS 3014 *BglII/HincII/PvuII*
 Lambda *HindIII*, pBR 322 *AluI*
 pMS 3014 *HincII/HindIII*
 pMS 3014 *HincII/EcoRI*
 pMS 201 *ClaI*
 pMS 3014 *ClaI*
 pMS 3014 *ClaI/EcoRI*

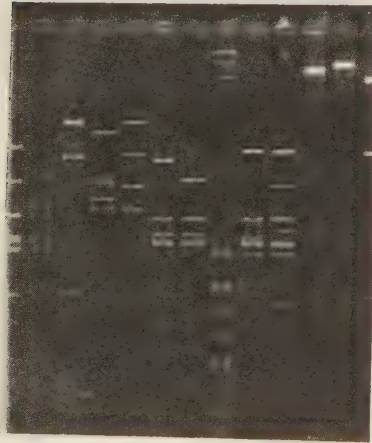


Abb.12: Restriktionsanalyse des *FAS1* Subklons pMS 3014

Je 2 Microgramm Plasmid-DNA von pMS 3014 wurden wie angegeben gespalten und das Spaltmuster nach Agarose-Gel Elektrophorese und EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.

Vergleich: Cosmid-Vektor pMS 201 *ClaI*;

Längen-Standards: Lambda-DNA, *HindIII*/pBR 322, *AluI*-Spaltgemisch.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

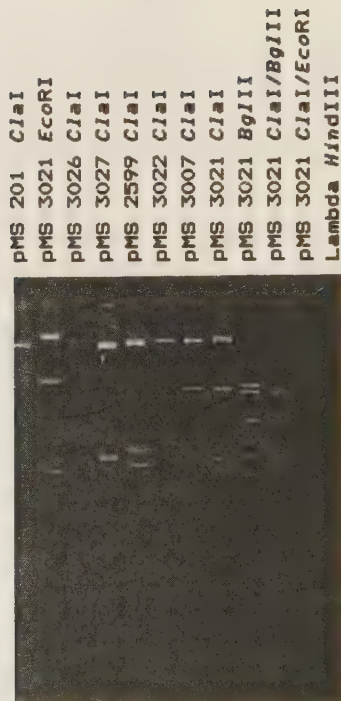


Abb.13: Restriktionskartierung der ClaI Schnittstellen in FAS1 DNA

Je 1-2 Microgramm der verschiedenen Plasmid-DNA's wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und das Spaltauster nach Agarose-Gel Elektrophorese und EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Die Lage der subklonierten FAS1-Fragmente ist aus Abb.23 ersichtlich.

Größen-Standard: Lambda-DNA HindIII.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

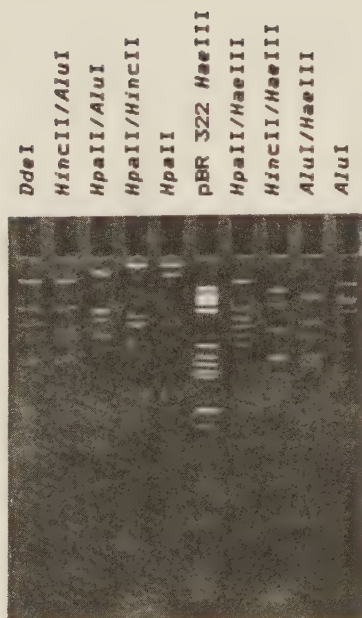


Abb.14: Restriktionsspaltungen zur Feinkartierung von pMS 3014

Das *Bam*HI/*Hind*III Hefe-DNA Fragment des Subklons pMS 3014 (vgl. Abb.23) wurde aus 'low melting point' Agarose isoliert, je 2 Microgramm des Fragments wie angegeben verdaut und in einem 8 % Acrylamid-Gel aufgetrennt. Das Spaltmuster wurde mit EtBr angefärbt und unter UV-Beleuchtung photographiert.

Längen-Standard: pBR 322 *Hae*III.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

Tabelle 1: Länge der in dieser Arbeit verwendeten
Standard-DNA Fragmente (74)

Die Fragmentgrößen sind in bp angegeben.

DNA	Lambda cl 857	pBR 322	
		AluI	HaeIII
Spaltung	HindIII		
	23150	910	587
	9420	659	540
	6560	655	504
	4380	521	458
	2320	403	434
	2020	281	267
	560	257	234
	(125)	226	213
		136	192
		100	184
		63	124
		57	123
		49	104
		19	89
		15	80
		11	64
			57
			51
			21
			18
			11
			7

Tabelle 2: Positionen der Restriktionsschnittstellen im FAS I Plasmid pMS 3021

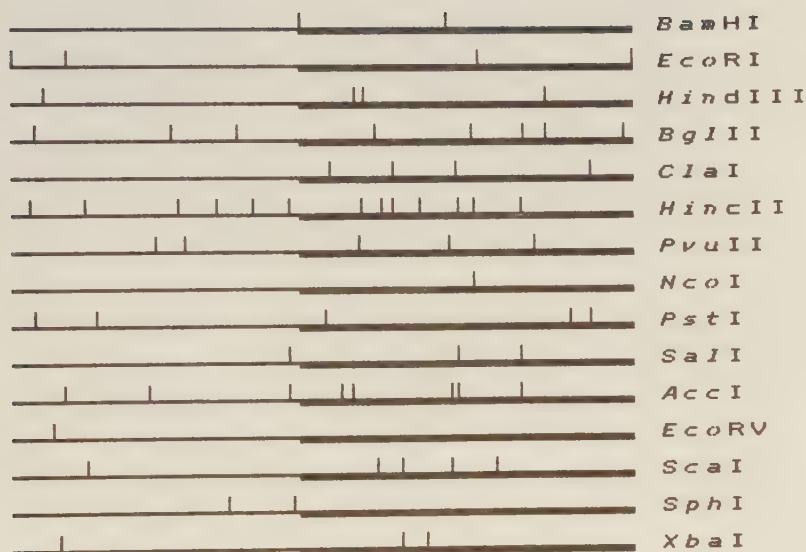
Die Koordinaten sind entsprechend der Restriktionskarte von pMS 3021 gewählt (vgl. Abb.15); 0 entspricht der linken *EcoRI* Schnittstelle im Vektor. Da Teilbereiche von pMS 3021 noch nicht sequenziert sind, können die Koordinaten der verschiedenen Restriktionsschnittstellen nur mit einer Genauigkeit von 20 - 50 bp angegeben werden.

Restriktions- endonuklease	Positionen (bp)	Restriktions- endonuklease	Positionen (bp)
<i>EcoRI</i>	0 1450 12160 16200	<i>HincII</i>	500 1910 4300 5340 6270
<i>BamHI</i>	7510 11330		7230 9090 9620
<i>HindIII</i>	840 8920 9150 13940		9920 10610 11630 12040 13280
<i>ClaI</i>	8280 9890 11560 15100	<i>AccI</i>	1390 3570 7230 8580 8870
<i>BglII</i>	600 4150 5860 9470 11960 13320 13900 15960	<i>XbaI</i>	1270 10160 10820
<i>PvuII</i>	3750 4500 9060 11390 13630	<i>HcoI</i>	12050
		<i>EcoRV</i>	1070
		<i>ScaI</i>	1970 9480
<i>PstI</i>	630 2210 8170 14550 15090		10140 11460 12620
		<i>SphI</i>	5620 7320
<i>SalI</i>	7230 11630 13280		

Tabelle 3: Größe der Restriktionsfragmente des Plasmids pMS 3021

Den durch Restriktionsanalyse ermittelten Werten für die Größen der verschiedenen Restriktionsfragmente sind die sich aus den bisher sequenzierten Bereichen von pMS 3021 ergebenden Werte gegenübergestellt.

Restriktions- endonuklease	Fragment- nummer	Fragment- größen Restr.	Seq.	Restriktions- endonuklease	Fragment- nummer	Fragment- größen Restr.	Seq.
		(kb)	(kb)			(kb)	(kb)
<i>EcoRI</i>	1)	10.7		<i>HincII</i>	1)	3.5	
	2)	4.1			2)	2.4	
	3)	1.45	1.453		3)	1.9	
					4)	1.4	1.407
<i>BamHI</i>	1)	12.4			5)	1.25	
	2)	3.8			6)	1.05	
<i>HindIII</i>					7)	1.0	1.014
	1)	8.1			8)	0.95	
	2)	4.8			9)	0.93	
	3)	3.1			10)	0.7	0.693
	4)	0.2	0.231		11)	0.52	0.523
<i>ClaI</i>					12)	0.4	0.411
	1)	9.4			13)	0.3	0.306
	2)	3.5		<i>AccI</i>	1)	4.3	
	3)	1.67	1.676		2)	3.7	
	4)	1.61			3)	2.6	
<i>BglIII</i>					4)	2.2	2.184
	1)	3.6			5)	1.65	
	2)	3.5	3.548		6)	1.35	
	3)	2.5	2.496		7)	0.3	
	4)	2.05			8)	0.2	0.195
	5)	1.7		<i>XbaI</i>	1)	8.9	
	6)	1.35			2)	6.7	
	7)	0.85			3)	0.7	0.659
	8)	0.6	0.608				
<i>PvuII</i>				<i>NcoI</i>	1)	16.2	
	1)	6.3					
	2)	4.6		<i>EcoRV</i>	1)	16.2	
	3)	2.3	2.329				
	4)	2.25					
	5)	0.75		<i>ScaI</i>	1)	7.5	
<i>PstI</i>					2)	5.5	
	1)	6.4			3)	1.3	1.318
	2)	6.0			4)	1.2	1.196
	3)	1.75			5)	0.66	0.655
	4)	1.6	1.577				
	5)	0.55		<i>SphI</i>	1)	14.5	
<i>SalI</i>					2)	1.7	1.707
	1)	10.2					
	2)	4.4					
	3)	1.65					



1 kb

Abb.15: Restriktionskarte des FAS1 Plasmids pMS 3021

Die dünne Linie gibt den Vektoranteil, die dicke Linie den Bereich der Hefe-DNA an.

Die Restriktionsenzyme *XhoI* und *SmaI* schneiden nicht in pMS 3021.

Falls im Text Restriktionsfragmente nummeriert werden, geschieht dies so, daß das größte Fragment als #1 bezeichnet wird und die anderen mit abnehmender Größe durchnummeriert werden.

4. Die Transkriptionsregion der FAS Gene

4.1 Kartierung der Transkriptionsregion von FAS1

Zur Feststellung, welcher Bereich der klonierten FAS1 DNA in mRNA transkribiert wird, wurde poly(A) RNA aus *S. cerevisiae* in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert ('Northern'-Blot). Die RNA's wurden mit verschiedenen, ³²P-markierten Restriktionsfragmenten des klonierten, die FAS1 Region überspannenden DNA-Bereichs hybridisiert. In Abb.16a sind die Hybridisierungsmuster der einzelnen Fragmente gezeigt. Ihre Herkunft ist der Restriktionskarte in Abb.16b, ihre chromosomale Lage relativ zueinander ist Abb.16c zu entnehmen.

Aus diesen Versuchen wird deutlich, daß die Transkriptionsregion von FAS1 in den Proben c und e vollständig, in Probe a nur zu einem geringen Teil enthalten ist. Die Größe des in Abb.16b dementsprechend auf ca. 7 kb eingegrenzten FAS1 Transkript-Bereiches stimmt gut mit der elektrophoretisch ermittelten Größe der FAS1 mRNA von ca. 6 kb (B. Schuh, Dissertation sowie eigene Messungen) und mit der aus dem Molekulargewicht der beta-Untereinheit (180000) errechneten Mindestgröße des FAS1 Gens von 4.7 kb überein.

Die Proben a und b hybridisieren, außer mit FAS1 mRNA, auch noch deutlich mit einer anderen, ca. 1.6 kb großen mRNA. Die Proben h, i und j, welche distal zu a sich an das FAS1 Gen anschließen, hybridisieren nicht mehr mit FAS1 mRNA, sondern mit vier, im Vergleich zu FAS1 mRNA deutlich kleineren (1 - 3 kb) mRNA Spezies. Auf die in Abb.16a ebenfalls gezeigte FAS2 mRNA (Bahn m) und ihre Hybridisierung mit geeigneten Proben wird weiter unten (vgl. S.61) noch im einzelnen eingegangen. Die DNA des Vektors pMS 201 hybridisiert, für sich allein genommen, nur außerordentlich schwach mit einer ca. 1 kb großen mRNA (Bahn k). Hierbei dürfte es sich um die zum Hefe-DNA Anteil dieses Vektors homologe TRP1 mRNA handeln.

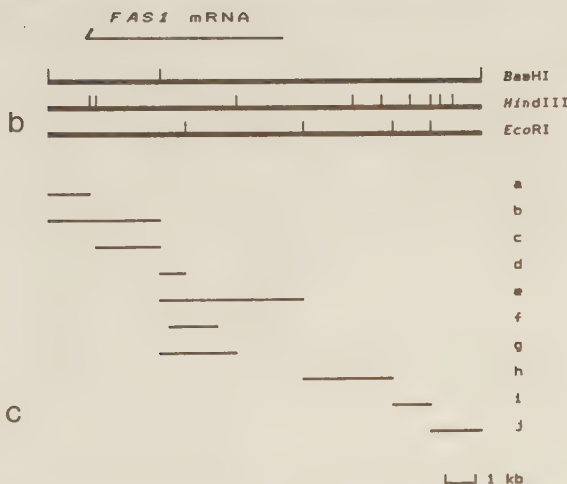
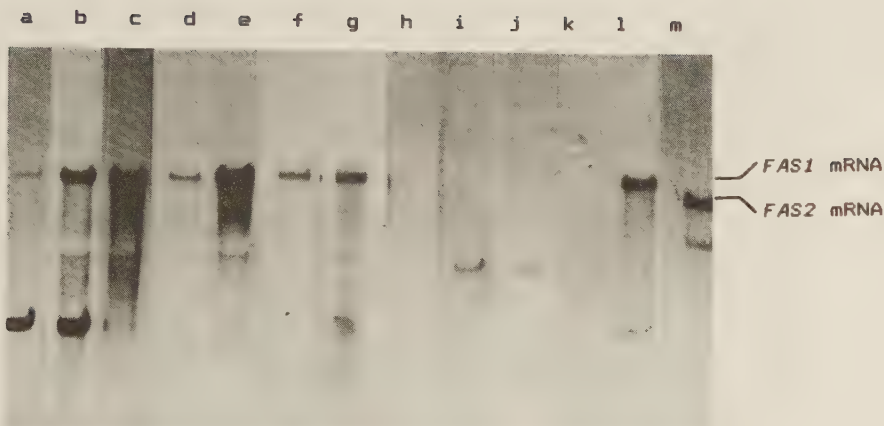


Abb.16: Northern-Hybridisierung von poly(A) RNA aus Hefe (a) mit verschiedenen Restriktionsfragmenten der FAS1 Region (c).

(a) Je 5 Microgramm poly(A) RNA aus *S. cerevisiae* SC9 wurden in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, die RNA auf Nitrocellulose transferiert und mit den in (c) angegebenen, ^{32}P markierten Restriktionsfragmenten der FAS1 Klone pMS 3021 und 2564 hybridisiert. Die Größe und Lage der verschiedenen zur Hybridisierung verwendeten Proben ist relativ zur FAS1 Restriktionskarte (b) dargestellt.

Zusätzlich zu den in (c) gezeigten Proben wurde noch mit dem Vektor pMS 201 (Probe k), dem intakten Plasmid pMS 3021 (Probe l) und dem FAS2 DNA-haltigen BaeHI Fragment #1 von pYc 1156 (Probe m) hybridisiert.

4.2 Untersuchung der poly(A) RNA aus Spleiß-defekten Hefemutanten

Von L. Hartwell waren eine Reihe von temperatursensitiven Hefemutanten isoliert worden, bei denen unter restriktiven Bedingungen die Synthese ribosomaler Proteine gehemmt war (20). Die nähere Charakterisierung einiger dieser *rna* Mutanten hatte ergeben, daß bei der als *rna1* bezeichneten Mutante der Transport von mRNA's vom Kern ins Cytoplasma gestört ist (75), während sich bei der Mutante *rna2* Vorstufen von mRNA's anhäufen. Diese Akkumulation von mRNA-Vorstufen konnte für eine Reihe von Genen ribosomaler Proteine (76) und für das Actin Gen (77) von *S. cerevisiae* auf einen Defekt im Spleiß-Mechanismus Intron-haltiger mRNA's zurückgeführt werden. Es sollte hier untersucht werden, ob in den beiden oben erwähnten *rna* Mutanten bestimmte, nicht prozessierte *FAS1* mRNA Vorstufen nachweisbar sind.

Die Hefe-Mutanten *rna1* und *rna2* wurden bei permissiver Temperatur (23°C) angezüchtet, die Hälfte der jeweiligen Kulturen für 1 h bei nicht permissiver Temperatur (36°C) inkubiert, aus den Zellen der vier verschiedenen Ansätze die poly(A) RNA isoliert, durch denaturierende Elektrophorese getrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Die Filter-gebundenen mRNA's wurden dann mit dem ³²P markierten *FAS1* Plasmid pMS 3021 und, als positive Kontrolle, auch mit einem Plasmid, welches das Hefe Actin-Gen enthält hybridisiert. Bei der Actin mRNA sollte in den *rna* Mutanten unter nicht permissiven Bedingungen neben der reifen mRNA noch eine, ca. 300 bp größere Vorstufe nachzuweisen sein (77). Auch in unseren Händen war dies tatsächlich der Fall (Abb.17b). Demgegenüber war bei der Hybridisierung von *FAS1* mRNA aus permissiv wie nicht permissiv gewachsenen Mutanten-Zellen nur eine einzige *FAS1* mRNA Spezies nachweisbar, welche die gleiche Größe wie in Wildtyphefe hatte (Abb.17a).

Dieses Ergebnis läßt zwei Schlußfolgerungen zu: a) das *FAS1* Gen der Hefe enthält entweder keine oder allenfalls nur sehr kleine Introns, oder b) die Prozessierung von *FAS1* mRNA wird durch die *rna1* bzw. *rna2* Mutation nicht beeinflusst.

4.3 Elektronenmikroskopie von *FAS1* mRNA - DNA Hybriden

Eine Überprüfung der klonierten *FAS1* DNA auf das Vorhandensein von Introns wurde auch von H. Burkhard und P. Franke durch elektronenmikroskopische DNA-RNA Heteroduplex Untersuchungen vorgenommen. Dabei wurden Hybride zwischen klonierter *FAS1* DNA (pMS 3021) und durch präparative Gelelektrophorese (s. Material und Methoden) angereicherter *FAS1* mRNA hergestellt und unter dem Elektronenmikroskop die entstandenen D-Loops analysiert. In Abb.18 sind mehrere potentielle Kandidaten derartiger D-Loop haltiger Bereiche gezeigt (Pfeile). In keinem dieser Bereiche läßt sich allerdings eine für Intron-haltige DNA zu erwartende zusätzliche Schleifenbildung ungepaarter DNA-Regionen feststellen. Die beobachteten D-Loops haben eine Größe von 2.5 - 4.4 kb und umfassen daher nur etwa die Hälfte des intakten *FAS1* Gens. Möglicherweise war die zur Hybridisierung eingesetzte *FAS1* mRNA bereits teilweise abgebaut. Jedenfalls haben diese, nicht weiter verfolgten Experimente keine verlässlichen Daten hinsichtlich des Vorhandenseins oder Fehlens von Introns im *FAS1* Gen der Hefe geliefert.

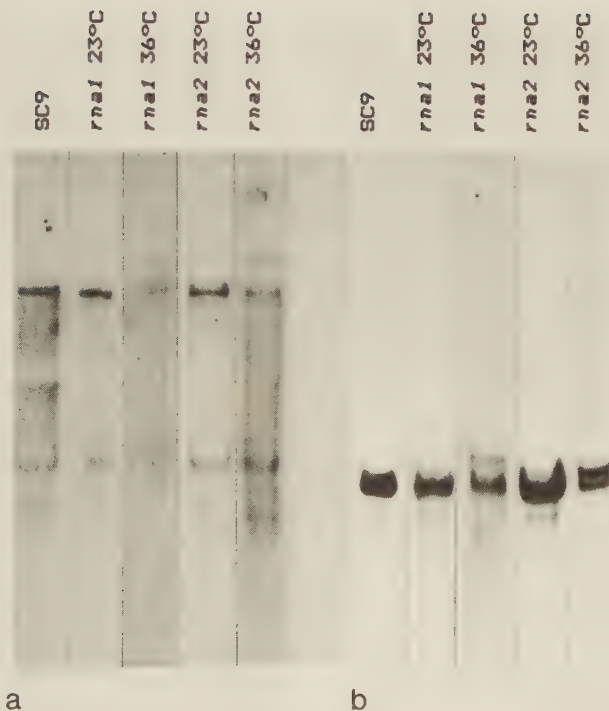


Abb.17: Analyse der *FAS1* (a) und Actin-Gen (b) Transkripte in *rna1* und *rna2* Hefe-Mutanten

Poly(A) RNA aus den Mutanten *rna1* und *rna2* welche unter permissiven (23°C) oder restriktiven (36°C) Bedingungen angezüchtet worden waren, wurde nach der 'Northern'-Transfer Methode auf Nitrocellulose-Filter transferiert, ein Filter mit ³²p markiertem pMS 3021 (*FAS1*, (a)), der andere mit klonierter Hefe Actin-DNA (b) hybridisiert. Als Kontrolle diente poly(A) RNA aus der Wildtyphefe SC9.

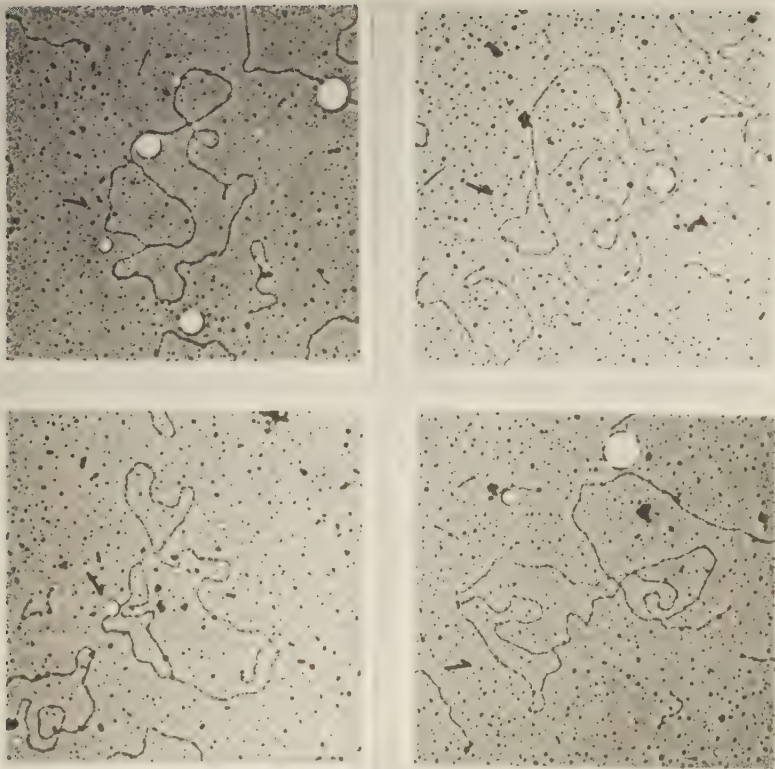


Abb.18: Elektronenmikroskopie von FAS1
mRNA - DNA Hybriden

FAS1 mRNA wurde durch präparative Gelelektrophorese (vgl. Material und Methoden) angereichert, mit pMS 3021 hybridisiert und für die Elektronenmikroskopie gespreitet (H. Burkhard). Die Pfeile zeigen D-Loop Bereiche an.

Maßstab: 1 kb = 1.13 cm

4.4: Kartierung der Transkriptionsregion von FAS2

Analog zu der oben geschilderten Kartierung des Transkriptionsbereichs von FAS1 wurde auch der Transkriptionsbereich des FAS2 Gens untersucht. Das Plasmid pMS 2583 enthält ein *Bam*HI Fragment von 23.5 kb Länge, welches das ganze FAS2 Gen von *S. cerevisiae* enthält (L. Roberts, unveröffentlichte Ergebnisse). Verschiedene Restriktionsfragmente von pMS 2583 wurden isoliert, durch Nick-Translation radioaktiv mit 32 P markiert und mit poly(A) RNA aus Hefe auf Nitrocellulose-Filtern hybridisiert (Abb.19a). In Abb.19c sind die verwendeten Fragmente in Korrelation zu der FAS2-Restriktionskarte (Abb.19c, T. Laux, Diplomarbeit) dargestellt.

Die FAS2 mRNA hybridisiert gemäß Abb.19a mit den Fragmenten b, c, d, e und f und überdeckt damit einen Bereich von ca. 9 kb. Die DNA-Proben a, b und c, welche auch noch die auf der einen Seite (links in Abb.19) an FAS2 angrenzende DNA enthalten, hybridisieren außer mit FAS2 mRNA auch mit mehreren anderen, kleineren mRNA Spezies (Abb.19a). Probe g, am gegenüber liegenden (rechts in Abb.19) Ende von FAS2 gelegen, hybridisiert mit einer einzelnen, ca. 3.5 kb großen mRNA, aber nicht mehr mit FAS2 mRNA (Abb.19a).

Die in Abb.19b angegebenen Grenzen des *fas2* Transkriptionsbereiches sind aufgrund von Größe und Zahl der verwendeten Northern-Hybridisierungsproben noch verhältnismäßig ungenau und dürften vor allem hinsichtlich der maximalen Länge dieses Bereichs aussagekräftig sein. Diese liegt mit ca. 8 kb (s.o.) deutlich über der aus der elektrophoretischen Beweglichkeit abgeleiteten Länge von 5.5 kb (vgl. Abb.16a, Bahn m) der FAS2 mRNA. Überraschenderweise wäre letztere nach diesem Kriterium sogar etwas kleiner als die FAS1 mRNA, obwohl das Translationsprodukt der FAS2 mRNA, die alpha-Untereinheit der Fettsäuresynthetase, größer als das der FAS1 mRNA, die beta-Untereinheit, ist.

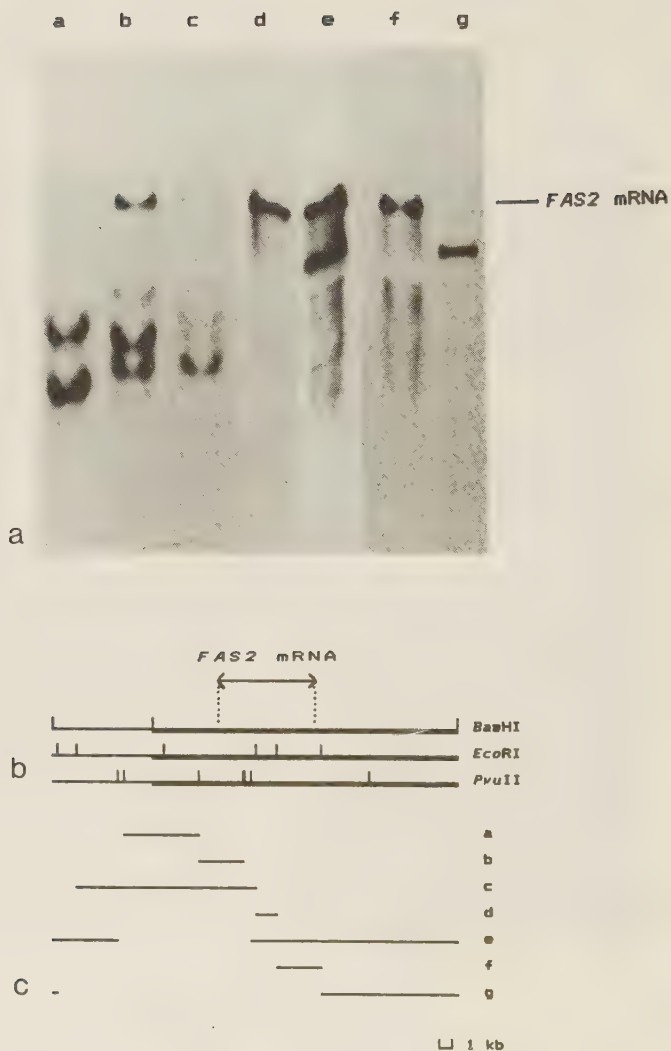


Abb.19: Northern-Hybridisierung von poly(A) RNA aus Hefe mit verschiedenen Restriktionsfragmenten der FAS2 Region

(a) Je 5 Microgramm poly(A) RNA der Wildtyphefe SC9 wurden unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit den in (c) in Relation zur Restriktionskarte der FAS2 Genregion (b, T. Laux) angegebenen Restriktionsfragmenten des FAS2 Plasmids pMS 2583 hybridisiert.

5. Subklonierung von FAS I Restriktionsfragmenten

5.1 Physikalische Charakterisierung von FAS I- Teilbereichen und Bestimmung ihrer Orientierung in den Vektoren pMS 201, pBR 322 und pBR 325

Von M. Schweizer und C. Lebert waren eine Reihe von Restriktionsfragmenten von pMS 3021 und pMS 2564 (vgl. Abb.23) subkloniert worden (8, 72). Meine Aufgabe war es zunächst, diese Subklone durch Restriktionsverdauung und Southern-Hybridisierung nochmals zu überprüfen; dieses ging Hand in Hand mit der oben beschriebenen Restriktionskartierung der FAS I Region. In Abb.20 sind mehrere repräsentative Restriktionsspaltungen der untersuchten Subklon-Plasmide gezeigt (siehe auch Abb.9 - 13). Entsprechend enthält Abb.21b ein Beispiel für die Southern-Hybridisierung des in Abb.21a gezeigten Restriktionsspaltamusters mit radioaktiv markierter, Vektor-freier DNA aus pMS 3021.

Alle in diesem Zusammenhang untersuchten Klone sind, neben anderen, in Tab.4 enthalten. Ebenso sind in der Tabelle die Art, Orientierung und Größe der subklonierten Fragmente aufgeführt. Die Orientierung der Fragmente relativ zu den jeweiligen Vektor-DNA's wurde durch Verdauung mit Restriktionsenzymen bestimmt, deren Schnittstellen in der Vektor- und FAS-DNA so lagen, daß aus den resultierenden Fragmentgrößen eindeutig auf die Orientierung der FAS-DNA im Plasmid geschlossen werden konnte (Abb.22). Dabei wurde die Orientierung der Hefe-DNA relativ zum Vektor in pMS 3021 als positiv (+) festgelegt und alle Subklone, bei denen die Orientierung gleichsinnig mit pMS 3021 war als positiv, alle mit umgekehrter Orientierung als negativ (-) bezeichnet. Wurden andere Vektoren als pMS 201 verwendet, so wurden sie beim Vergleich mit pMS 201-haltigen Plasmiden so ausgerichtet, daß die Replikationsrichtung des Plasmids und die Transkriptionsrichtung des Ampicillin-Resistenz Gens bei den Vektoren übereinstimmen. Als Beispiel für die Bestimmung der Orientierung eines Subklons sei pMS 3025 aufgeführt: pMS 3025 ist 9230 bp groß und besitzt zwei EcoRI Schnittstellen im Vektor und eine in der inserierten FAS I-DNA (vgl. Abb.15 und Abb.23). Bei positiver Orientierung sollen sich somit nach EcoRI Spaltung drei Fragmente von 6250, 1530 und 1450 bp, bei negativer Orientierung solche von 7210, 1450 und 570 bp ergeben. Tatsächlich treten im Gel neben einem ca. 6 kb großen Fragment deutlich zwei um 1.5 kb große Fragmente auf (Abb.22, Bahn 10). Daher hat dieser Klon die Orientierung +.

Die Orientierung der anderen Subklone wurde analog zum geschilderten Beispiel ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengefaßt und graphisch in den Abb.23 und 25 dargestellt. Bei Transformationsversuchen (L. Roberts, unveröffentlichte Ergebnisse) von *S. cerevisiae fasI* Mutanten konnte ein Einfluß der Orientierung auf die Transformationsraten nicht festgestellt werden, obwohl z.T. das gleiche Fragment in beiden Orientierungen kloniert vorlag (pMS 3027-3028, pMS 3101-3102).

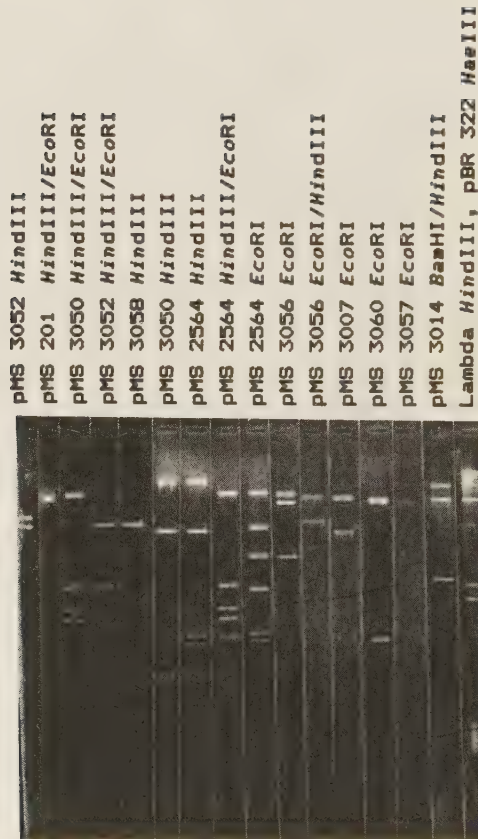


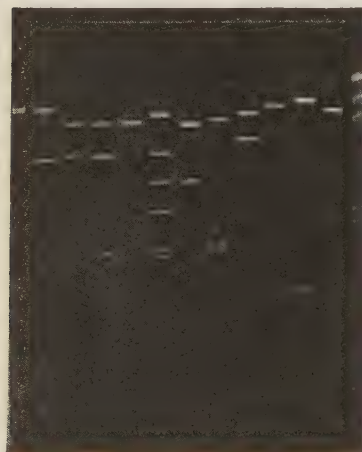
Abb.20: Restriktionsspaltung verschiedener FAS1 Subklone

Je 2 Microgramm der Plasmid-DNA verschiedener FAS1 Subklone wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Das Spaltmuster wurde mit EtBr gefärbt und unter UV-Beleuchtung photographiert.

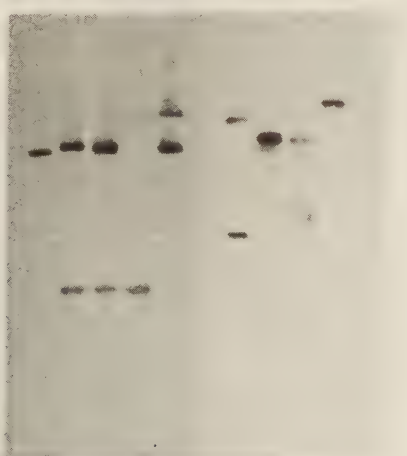
Größen-Standards: Lambda-DNA *Hind*III, pBR 322 *Hae*III.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

pMS 3080 *Bam*HI
 pMS 2599 *Bam*HI
 pMS 3007 *Bam*HI/*Eco*RI
 pMS 3021 *Bam*HI/*Eco*RI
 pMS 3054 *Bam*HI/*Eco*RI
 pMS 2564 *Eco*RI
 pMS 3065 *Eco*RI
 pMS 3025 *Eco*RI
 pMS 3002 *Hind*III
 pMS 3026 *Hind*III
 pMS 3027 *Hind*III
 pMS 3036 *Hind*III
 Lambda *Hind*III



pMS 3080 *Bam*HI
 pMS 2599 *Bam*HI
 pMS 3007 *Bam*HI/*Eco*RI
 pMS 3021 *Bam*HI/*Eco*RI
 pMS 3054 *Bam*HI/*Eco*RI
 pMS 2564 *Eco*RI
 pMS 3065 *Eco*RI
 pMS 3025 *Eco*RI
 pMS 3002 *Hind*III
 pMS 3026 *Hind*III
 pMS 3027 *Hind*III
 pMS 3036 *Hind*III



b

Abb.21: Restriktionsspaltung und Southern-Hybridisierung
verschiedener FAS1 Subklone

Je 2 Microgramm der Plasmid-DNA verschiedener Subklone wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, die Spaltungen elektrophoretisch aufgetrennt und nach EtBr-Färbung und Photographie des Spaltmusters unter UV-Beleuchtung (a) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die gebundenen Fragmente wurden mit ^{32}P markierter pMS 3021 DNA - ohne deren Vektoranteil - hybridisiert (b).

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

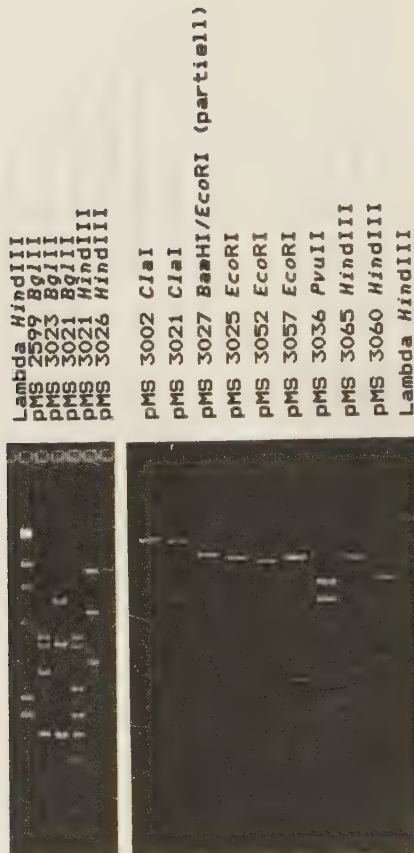


Abb.22: Restriktionsverdauungen zur Feststellung der Orientierung inserierter FAS-DNA im Vektor

Je 2 Microgramm Plasmid-DNA der zu untersuchenden FAS1 Subklone wurden wie angegeben restriktionsgespalten und das Spaltauster nach Elektrophorese in einem Agarose-Gel und EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.

Längen-Standards: Lambda-DNA HindIII.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

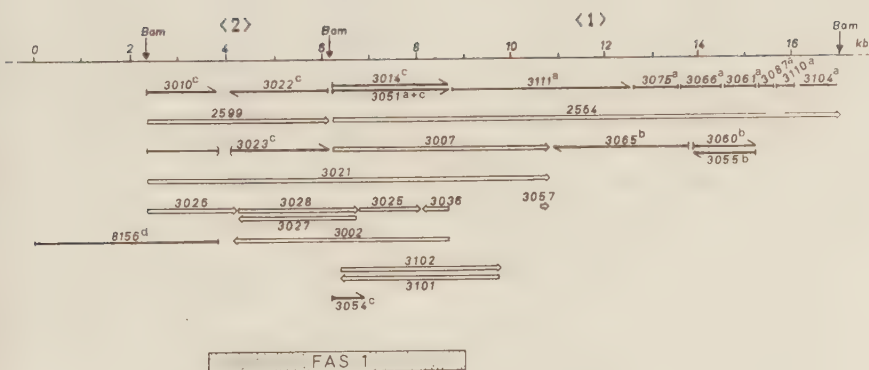


Abb.23: Subklonierte FAS1 Fragmente und ihre Orientierung im Vektor

Unterfragmente der zwei klonierten FAS1 BamHI Fragmente <1> und <2> (vgl. Abb.6d) wurden subkloniert in pMS 201 (offene Pfeile), pBR 322 (Index a), pBR 325 (Index b), pMS 201 ohne den TRP1/ARS1-Hefereplikator von *S. cerevisiae* (Index c) oder YEp13 (Index d). Die Pfeile geben die Orientierungen in den verschiedenen Vektoren relativ zu pMS 3021 an.

Tabelle 4: Subklonierte Restriktionsfragmente aus dem Bereich des FAS1 Gens

pMS 201* ist der Vektor pMS 201 ohne den TRP1/ARS1-Hefereplikator. Die mit (') bezeichneten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit konstruiert. Die relative chromosomale Position der subklonierten FAS1-Fragmente ist aus den Abb.23 und 25 zu entnehmen.

Name des Plasmids	kloniertes Fragment	Größe des Fragments (bp)	Vector	Orientierung
pMS 2599	BamHI #3 von pYc 2620	3820	pMS 201	+
pMS 2564	BamHI #1 von pYc 1154	10930	pMS 201	+
pMS 3014	BamHI/HindIII #3 von pMS 2564	2610	pMS 201*	+
pMS 3002	HindIII #2 von 33 FI	4785	pMS 201	+
pMS 3010	BamHI/HindIII #3 von pMS 2599	1410	pMS 201*	+
pMS 3022	BamHI/HindIII #2 von pMS 2599	2180	pMS 201*	-
pMS 3023	BamHI/HindIII #2, #3 von pMS 2599	3590	pMS 201	+
pMS 3007	BamHI/EcoRI #2, #7 von pMS 2564	4880	pMS 201	+
pMS 3021	BamHI #2 von pMS 2599 in pMS 3007 BamHI	8700	pMS 201	+
pMS 3025	BglII #6 von pMS 3021	1350	pMS 201	+
pMS 3026	BglII/BamHI #2 von pMS 2599	1960	pMS 201	+
pMS 3027	BglII #3 von pMS 3021	2500	pMS 201	-
pMS 3028	BglII #3 von pMS 3021	2500	pMS 201	+
pMS 3036	BglII #6 von pMS 3021	1350	pMS 201	-
pMS 3054	BamHI/EcoRI #5	830	pMS 201*	+
pMS 3057	BglII/EcoRI #11 von pMS 3021	250	pMS 201	+
pMS 3055	EcoRI #6 von pMS 2564	1350	pBR 325	-
pMS 3060	EcoRI #6 von pMS 2564	1350	pBR 325	+
pMS 3061	HindIII #7 von pMS 2564	730	pBR 322	
pMS 3065	EcoRI #3 von pMS 2564	2980	pBR 325	-
pMS 3066	HindIII #4 von pMS 2564	990	pBR 322	
pMS 3075	HindIII #5 von pMS 2564	950	pBR 322	
pMS 3087	HindIII #9 von pMS 2564	340	pBR 322	
pMS 3101	Clal #2 von pMS 3021	3530	pMS 201	-
pMS 3102	Clal #2 von pMS 3021	3530	pMS 201	+
pMS 3104	HindIII #3 von pMS 2564	1420	pBR 322	
pMS 3110	HindIII #8 von pMS 2564	430	pBR 322	
pMS 3111	HindIII #2 von pMS 2564	3910	pBR 322	+
pMS 7800	HindIII	4800	YeP 13	
pMS 8156	HindIII	3900	YeP 13	

pMS 3173'	PvuII #1 von pMS 3021	6300	pMS 201	
pMS 3175'	ClaI #1 von pMS 3021	9400	pMS 201	+
pMS 3176'	ClaI #1, #2 von pMS 3021	12930	pMS 201	+
pMS 3177'	ClaI #1, #3 von pMS 3021	11070	pMS 201	
pMS 3178'	ClaI #4 von pMS 3021	1610	pCEN 11-3-1	
pMS 3179'	ClaI #1 von pMS 3021	9400	pCEN 11-3-1	
pMS 3180'	ClaI #1, #2, #4	14540	pMS 201	+
pMS 3181'	ClaI #3 von pMS 3021	1670	pCEN 11-3-1	
pMS 3182'	ClaI #1, #2, #3 von pMS 3021	14600	pMS 201	+
pMS 3183'	pMS 3007 + BamHI/SmaI Adaptor	4880	pMS 201	+
pMS 3184'	ClaI #1, #2 von pMS 3021	12930	pCEN 11-3-1	
pMS 3185'	PvuII #3 von pMS 3021	2330	pBC 351	+
pMS 3186'	PvuII #3 von pMS 3021	2330	pBC 351	-
pMS 3187'	pMS 3021 + BamHI/SmaI Adaptor 'links'	8700	pMS 201	+
pMS 3188'	pMS 3021 + BamHI/SmaI Adaptor 'rechts'	8700	pMS 201	+
pMS 3191	SmaI pMS 3187, BaI31	15350	pMS 201	+
pMS 3192	SmaI pMS 3187, BaI31	15200	pMS 201	+
pMS 3193	SmaI pMS 3187, BaI31	14000	pMS 201	+
pMS 3194	SmaI pMS 3187, BaI31	10500	pMS 201	+
pMS 3195	SmaI pMS 3187, BaI31	10700	pMS 201	+
pMS 3196	SmaI pMS 3187, BaI31	10100	pMS 201	+
pMS 3226	SmaI pMS 3187, BaI31	12000	pMS 201	+
pMS 3255	SmaI pMS 3187, BaI31	9400	pMS 201	+
pMS 3256	SmaI pMS 3187, BaI31	8050	pMS 201	+
pMS 3257	SmaI pMS 3187, BaI31	7900	pMS 201	+

5.2 Klonierung von FAS1 Fragmenten in die Centromer-haltigen Vektoren pBC 351 und pCEN 11-3-1

Um zu untersuchen, ob die Transformationsrate von klonierten FAS1 Fragmenten durch deren mitotische Stabilisierung in FAS1 Hefetransformanten-Zellen erhöht werden kann, wurden verschiedene ClaI und PvuII Restriktionsfragmente von pMS 3021 in die CEN 3 bzw. CEN 11 haltigen Vektoren pBC 351 (17) und pCEN 11-3-1 (18) eingebaut. Diese Vektoren enthalten außerdem - ebenso wie pMS 201 - das TRP1/ARS1-haltige, 1.45 kb große EcoRI Fragment aus *S. cerevisiae*.

Bei diesen Klonierungsexperimenten fielen zusätzlich zu den gewünschten Centromer-haltigen Plasmiden auch eine Reihe von Klonen an, die ClaI oder PvuII Fragmente von pMS 3021 in pMS 201 enthalten. Die Klone pMS 3101 und pMS 3102, die das ClaI Fragment #2 enthalten, waren von uns zuvor schon hergestellt worden. ClaI Fragmente wurden mit pCEN 11-3-1 und PvuII Fragmente mit pBC 351 ligiert, mit dem Ligationsansatz *E. coli* RRI transformiert und die Plasmide der Amp^r Einzelklone nach der 'mini-screen' Methode untersucht (Abb.24). Die erhaltenen Klone (pMS 3173 bis pMS 3186) sind in Tab.4 aufgeführt, ihre Lage innerhalb der Restriktionskarte von pMS 3021 ist in Abb.25 wiedergegeben.

Von L. Roberts durchgeführte Transformationsversuche von Hefe mit diesen Centromer-haltigen Plasmiden ergaben, daß ihre Transformationsraten, verglichen mit Centromer-freien Plasmiden, nicht höher, sondern eher erniedrigt waren. Die erhaltenen Hefetransformanten waren, wie erwartet, mitotisch stabil.

pMS 3021	ClaI
pMS 3176a	ClaI
pMS 3176b	ClaI
pMS 3177	ClaI
pMS 3178a	ClaI
pMS 3178b	ClaI
pMS 3179	ClaI
pMS 3181a	ClaI
pMS 3181b	ClaI
pMS 3182	ClaI
pMS 3184	ClaI

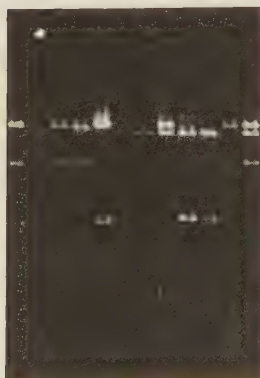


Abb.24: Restriktionsmuster verschiedener FAS1 Subklone
in den Centromer-haltigen Vektoren pBC 351
und pCEN 11-3-1

Je 1-2 Microgramm der Plasmid-DNA aus den verschiedenen Subklonen wurden mit *ClaI* verdaut und das Spaltmuster nach Agarose-Gel Elektrophorese und EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Bzgl. der chromosomalen Zuordnung der subklonierten DNA-Fragmente vgl. Abb.25.

Als Vergleich diente eine *ClaI*-Spaltung von pMS 3021.
 Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

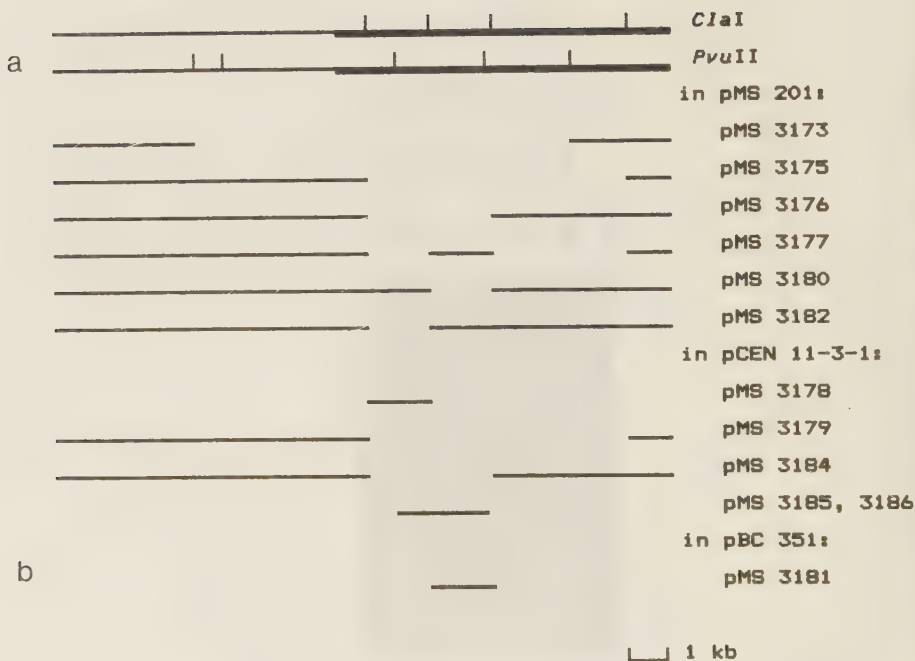


Abb.25: Neu konstruierte FAS1 Subklone in pMS 201, pBC 351 und pCEN 11-3-1

In (b) sind die DNA-Bereiche von pMS 3021 angegeben, welche die verschiedenen Subklone enthalten. Die Eigenschaften der Vektoren sind in Material und Methoden beschrieben. In (a) ist die *Cla*I- und *Pvu*II-Restriktionskarte von pMS 3021 gezeigt (dünn = Vektor-DNA; dick = FAS1-DNA).

5.3 Einbau einer SmaI Schnittstelle in pMS 3021 und Charakterisierung von daraus hergestellten BaI31 Deletionsplasmiden

Die Reihenfolge und ungefähre Ausdehnung der verschiedenen funktionellen Domänen in dem pentafunktionellen FAS1 'Cluster'-Gen war von L. Roberts durch Transformation von fas1-Mutanten unterschiedlicher Komplementationgruppen mit den in Abb.23 aufgeführten subklonierten FAS1-Fragmenten ermittelt worden (L. Roberts, unveröffentlichte Ergebnisse). Zur feineren Abgrenzung der einzelnen Domänen innerhalb des Gens sollte eine Serie von Plasmiden hergestellt werden, in denen die in pMS 3021 klonierte FAS1-DNA sukzessive durch die Exonuklease BaI31 verkürzt worden war.

Voraussetzung für diese Experimente war die Verfügbarkeit eines Plasmids, welches die ganze FAS1 Region enthält und durch eine Restriktionsendonuklease möglichst nur ein einziges Mal und das am Anfang oder Ende des klonierten FAS1 Gens geschnitten wird. Für pMS 3021 waren bisher nur Restriktionsenzyme gefunden worden, die entweder mehrmals, überhaupt nicht oder, wenn nur einmal (NcoI), dann mitten im Gen schnitten. Um trotzdem eine Linearisierung des Plasmids an geeigneter Stelle möglich zu machen, sollte in eine der beiden Begrenzungsstellen zwischen FAS1-DNA und Vektor-DNA im Plasmid pMS 3021 (BamHI bzw. EcoRI, vgl. Abb.15) ein sog. SmaI-Adaptor eingefügt werden. pMS 3021 besitzt von sich aus keine SmaI-Schnittstelle. Ein käuflicher, einzelsträngiger BamHI/SmaI-Adaptor hat die Sequenz d(GATCCCCGGG) und vermag, wie in Abb.26 gezeigt, sowohl mit sich selbst wie auch mit den überstehenden Enden einer BamHI-Schnittstelle zu paaren, wobei zusätzlich eine SmaI-Schnittstelle an der Stelle der ursprünglichen BamHI Restriktionsstelle entsteht.

Es wurde daher pMS 3021 in getrennten Ansätzen sowohl mit EcoRI als auch mit BamHI partiell verdaut. Dadurch sollte jeweils nur eine der beiden BamHI bzw. der drei EcoRI Schnittstellen im Plasmid geöffnet werden (vgl. Abb.15). Gewünscht war eine Öffnung der Schnittstelle, welche die FAS1-DNA gegenüber der Vektor-DNA abgrenzt (vgl. Abb.15). Wie Abb.27 zeigt, waren mit 5 U BamHI bzw. EcoRI 50 Microgramm DNA bereits in 3 min vollständig gespalten. Als Partialhydrolysate kamen daher nur die beiden 30 sek Ansätze in Frage. 1 Microgramm der BamHI-Partialsplattung wurde mit 1 Microgramm des BamHI/SmaI-Adaptors, welcher, zur Selbstpaarung, vorher kurz gekocht und langsam abkühlen gelassen wurde, ligiert, mit dem Ligationsgemisch *E. coli* transformiert und die Plasmide der entstehenden Einzelkolonien durch Restriktionsverdauung untersucht. Von ca. 200 untersuchten Plasmiden hatten 19 das 3.8 kb BamHI-Fragment von pMS 3021 (vgl. Abb.15) verloren und den Adaptor eingebaut, 7 hatten das BamHI-Fragment nicht verloren und enthielten den BamHI/SmaI-Adaptor in der äußeren (Klone #1-3 u. 10-13 in Abb.28), 4 in der internen (Klone 4-7 in Abb.28) BamHI-Schnittstelle der FAS1-DNA.

Von M. Schweizer und L. Roberts wurde das so linearisierbare gemachte FAS1 Plasmid pMS 3187 mit SmaI gespalten und in einer Versuchsreihe mit BaI31 über verschiedenen lange Zeiträume verdaut. Nach Inaktivierung des Enzyms wurden die verkürzten DNA-Moleküle religiert und mit ihnen *E. coli* transformiert. Die Plasmid-DNA einer Reihe von so erhaltenen Einzelklonen wurde isoliert und das Ausmaß der entstandenen Deletionen durch vergleichende Restriktionsspaltungen mit den Enzymen BglII, HincII und ClaI festgestellt (nicht gezeigt). Abb.29 zeigt die verschiedenen, so charakterisierten Plasmide mit den Grenzen der durch BaI31 erzeugten Deletionen.

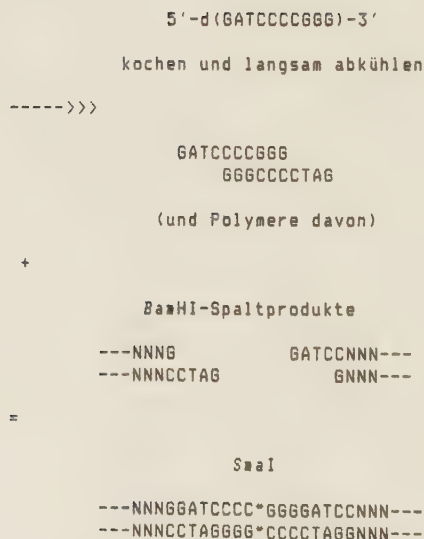


Abb.26: Struktur und Funktion eines
BamHI/SmaI-Adaptors

Es ist die Sequenz des als BamHI/SmaI-Adaptor verwendeten Oligodesoxynukleotids (PL-Pharmacia), seine Selbstpaarung und Ligation in BamHI-Restriktionsschnittstellen gezeigt.

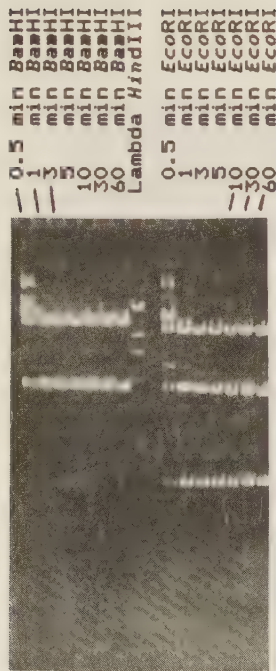


Abb.27: Partielle *Bam*HI und *Eco*RI Spaltung
von pMS 3021

50 Microgramm Plasmid-DNA pMS 3021 wurden in einem Volumen von 40 Microlitern mit 5 U *Bam*HI bzw. mit 5 U *Eco*RI bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 5 Microliter den Verdauungsansätzen entnommen und das Enzym durch 10 min Erhitzen auf 60°C inaktiviert. Von den zu verschiedenen Zeiten gestoppten Ansätzen wurde je 1 Microliter auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoresiert. Das Spaltmuster wurde nach EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.

Längen-Standard: Lambda-DNA *Hind*III.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

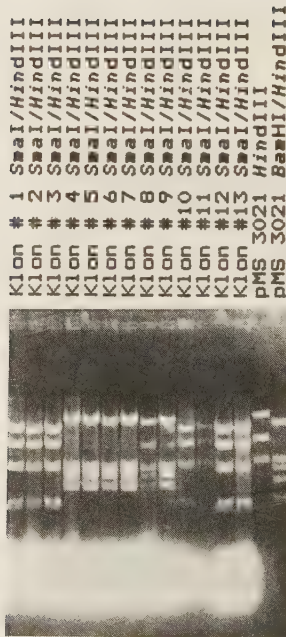


Abb.28: Restriktionsanalyse von Plasmiden mit eingebautem BamHI/SmaI Adaptor

1 Microgramm BamHI/SmaI Adaptor wurde mit 1 Microgramm partiell mit BamHI gespaltenem pMS 3021 ligiert und mit dem Ligationsgemisch *E. coli* RR1 transformiert. Von isolierten Einzelklonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit SmaI/HindIII gespalten. Nach Agarose-Gel Elektrophorese wurde das Spaltmuster mit EtBr angefärbt und unter UV-Beleuchtung fotografiert.

Als Vergleich diente pMS 3021 DNA mit HindIII und mit HindIII/BamHI gespalten. Die Lage der BamHI- und HindIII-Schnittstellen in pMS 3021 ist Abb.15 zu entnehmen.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

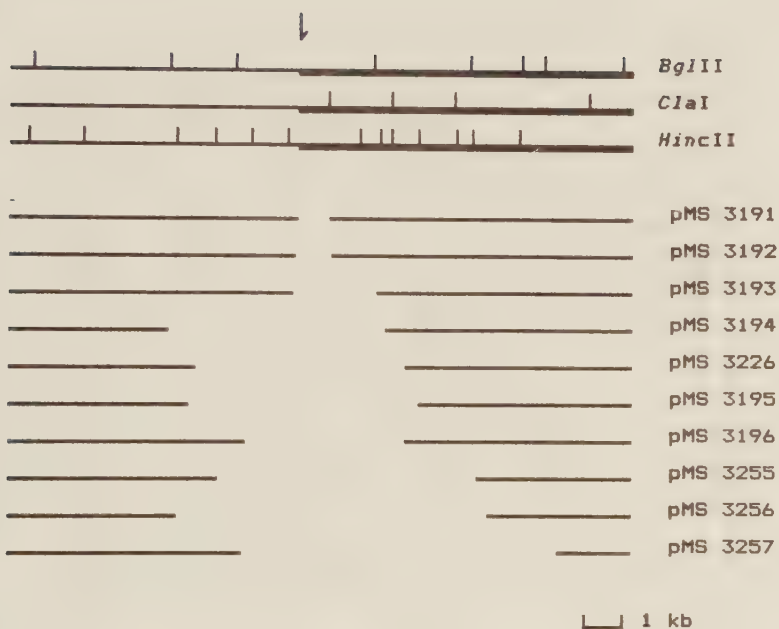


Abb.29: *BaI31* Deletionsplasmide

Die Karte gibt das Ausmaß der, ausgehend von der mit einem Pfeil markierten *Sma*I-Schnittstelle, durch *BaI31* in pMS 3021 erzeugten Deletionen in Relation zur *FAS1* Restriktionskarte an.

5.4 Klonierung von Restriktionsfragmenten in M13 Vektoren

Zur Sequenzierung von *FAS1*-DNA nach der Dideoxynukleotid Terminationsmethode (Sanger, 65) und ebenso für die Transformation von Hefe *fas*-Mutanten wurden eine Reihe von Restriktionsfragmente des *FAS1* Plasmids pMS 3021 in M13 Vektoren eingebaut. Abb.30 zeigt die 'Polylinker'-Region der verschiedenen M13 Vektoren und die Sequenz des universellen M13 Primers.

pMS 3021 wurde mit *Bam*HI/*Pst*I bzw. mit *Bam*HI/*Hind*III gespalten, ebenso die Vektoren M13 mp8 und M13 mp11. Die DNA's wurden ligiert und mit dem Ligationsansatz *E. coli* 71-18 transfiziert. Die Phagen der auftretenden hellen Plaques wurden in *E. coli* vermehrt und sowohl die doppelsträngige, replikative Form der Phagen-DNA wie auch die einzelsträngige Phagen-DNA isoliert (siehe Material u. Methoden).

Zur Identifizierung von Phagen mit eingebauter Hefe-DNA wurde die doppelsträngige DNA mit *Bam*HI/*Pst*I bzw. *Bam*HI/*Hind*III gespalten und die Spaltprodukte in einem Agarose-Gel mit ebenso gespaltenen pMS 3021 DNA verglichen. Wie aus Abb.31 hervorgeht, wurden alle theoretisch zu erwartenden *Bam*HI/*Pst*I-Fragmente (#2, #3 und #6) und *Bam*HI/*Hind*III-Fragmente (#3, #4 und #5) auch tatsächlich in M13 subkloniert erhalten. Die *Bam*HI/*Pst*I Fragmente #2 und #3 sind fast gleich groß, lassen sich aber durch eine *Eco*RI Schnittstelle in *Bam*HI/*Pst*I #2 unterscheiden. Die Ergebnisse entsprechender Analysen (nicht gezeigt) führten zu den in Abb.34 gezeigten Bezeichnungen und Positionsangaben der betreffenden subklonierten Fragmente.

Die einzelsträngige DNA der rekombinanten Phagen wurde in einem 0.8 % Tris-Acetat Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Phagen-DNA's mit eingebauten Hefe-Sequenzen im Gel langsamer wandern als reine M13 DNA (Abb.32). Bei der dritten Methode zur Identifizierung Hefe DNA-haltiger M13 Phagen wurde 1 Microliter der einzelsträngigen DNA verschiedener Phagen auf Nitrocellulose aufgetragen und mit radioaktiv markierter pMS 3021 DNA hybridisiert. Diese Tüpfelmethode ('dot'-Hybridisierung) erlaubt auch die Selektion von Phagen mit kurzen inserierten Sequenzen, welche bei der in Abb.31 angeführten 'mini-screen' Methode nicht erfaßt werden. Sie wurde z.B. in dem in Abb.33 gezeigten Experiment angewandt. Hier waren Unterfragmente des pMS 3021 *Eco*RI/*Bam*HI-Fragmentes #5 durch Spaltung mit *Acc*I und *Bgl*II hergestellt und in M13 mp8 ligiert worden. Nach Transformation von *E. coli* 71-18 mit dem Ligationsgemisch wurde aus den Phagen weißer Plaques die einzelsträngige DNA isoliert, je 1 Microliter der DNA's auf Nitrocellulose-Filter aufgetragen und mit ³²P-markierter pMS 3021 DNA hybridisiert. Man sieht, daß von wenigen nicht eindeutig zu beurteilenden Fällen abgesehen, deutlich zwischen Hybridisations-positiven und -negativen Klonen unterschieden werden kann.

In die einzige *Eco*RI-Schnittstelle der so erhaltenen Klone (vgl. Abb.30) wurde von H. Köttig das *TRP1/ARS1 Eco*RI Fragment von *S. cerevisiae* ligiert um diesen DNA's die Möglichkeit zur Selbstreplikation in Hefe zu geben. Mit den neu konstruierten doppelsträngigen DNA's wurden *FAS1* Hefemutanten transformiert (L. Roberts), während die entsprechenden einzelsträngigen Phagen-DNA's (mit oder ohne *TRP1/ARS1*) zu Sequenzierungsstudien (s.u.) verwandt wurden.

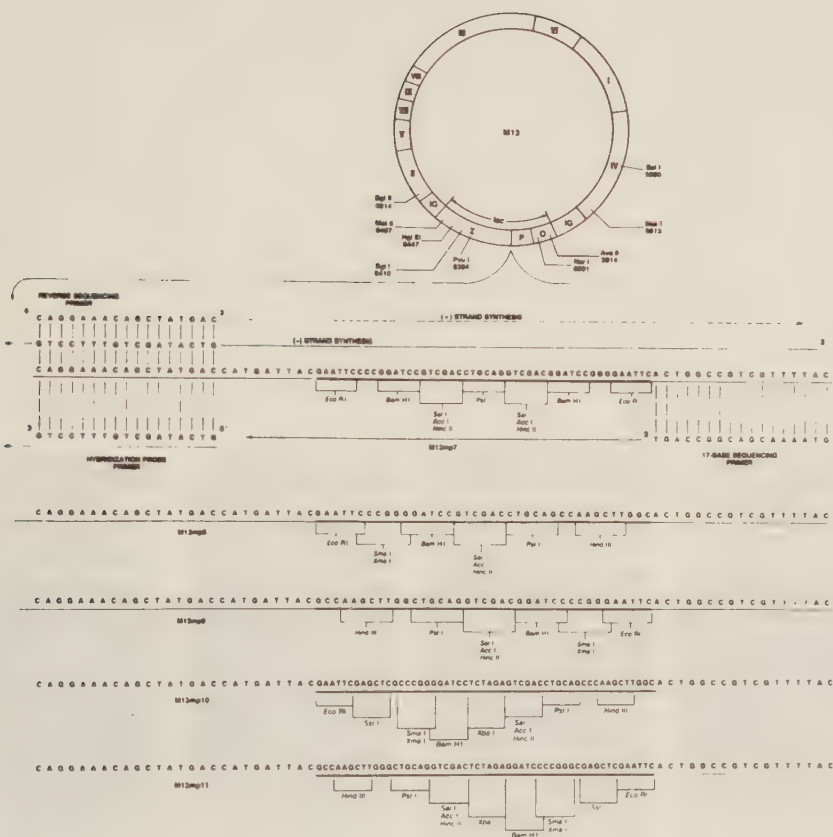
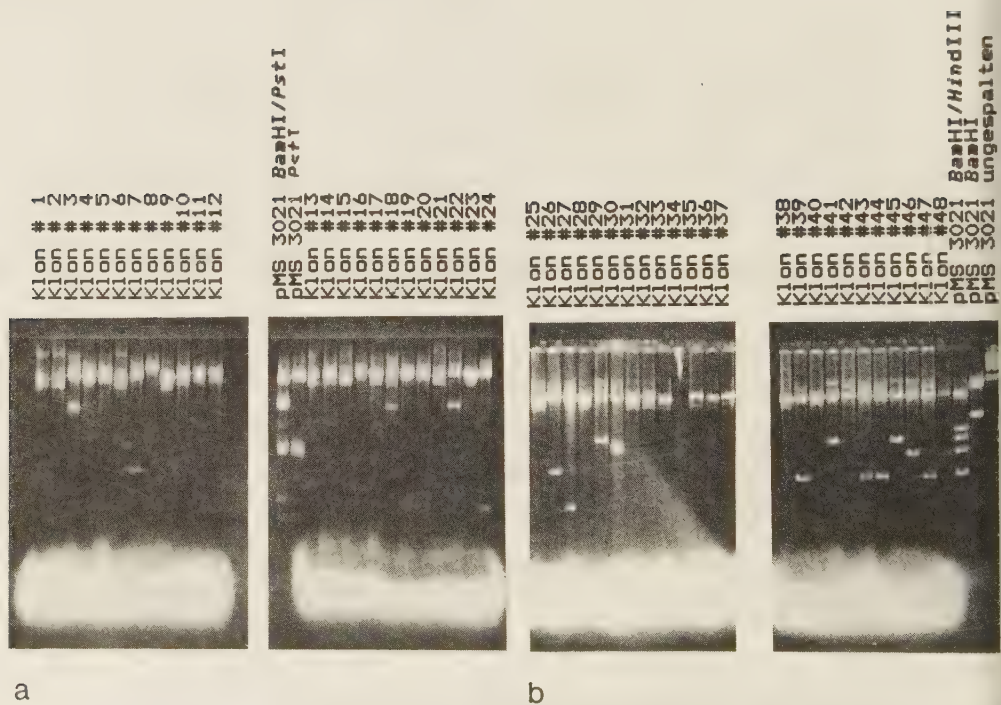


Abb.30: Die Insertionsregion verschiedener M13 Vektoren

In der Abbildung ist oben die ringförmige Karte eines Derivats des *E. coli* Phagen M13 mit der Lage der verschiedenen Phagen-Gene (I-IX, IG), der künstlich eingefügten partiellen Lac-Operon Region (lac) und der Schnittstellen einiger Restriktionsenzyme gezeigt.

Darunter sind die Sequenzen der Polylinker-Region der M13 Vektoren mp7, mp8, mp9, mp10 und mp11 (78), ebenso die Lage und Sequenz des Sequenzierungs-, des 'reverse' Sequenzierungs- und des Hybridisierungsprimers aufgeführt. Die Erkennungssequenzen der verschiedenen Restriktionsenzyme in der Polylinker-Region der unterschiedlichen M13 Vektoren sind durch Klammern gekennzeichnet.

Die Abbildung ist einem Katalog der Firma Pharmacia P-L Biochemicals, Freiburg entnommen.



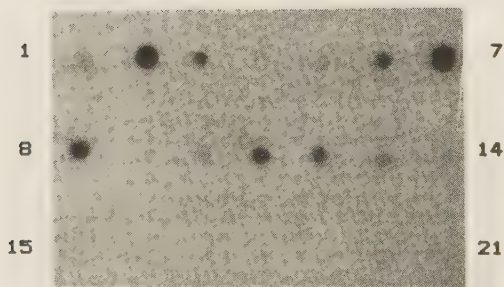


Abb.33: Identifizierung von M13 Phagen mit eingebauter FAS1-DNA durch Dot-Hybridisierung

Je 1 Microgramm einzelsträngige DNA der verschiedenen Phagen-Klone wurde auf Nitrocellulose-Filter aufgetragen und nach Fixierung bei 80°C im Vakuum mit ^{32}P -markierter pMS 3021 DNA (2 ml Hybridisierungslösung; ca. 1.5×10^6 cpm; bzgl. weiteren Einzelheiten siehe Material und Methoden) hybridisiert. Als Kontrolle diente M13 mp8 DNA mit (Nr.7) bzw. ohne (Nr.21) eingebautem pMS 3021 EcoRI/BamHI Fragment #5.

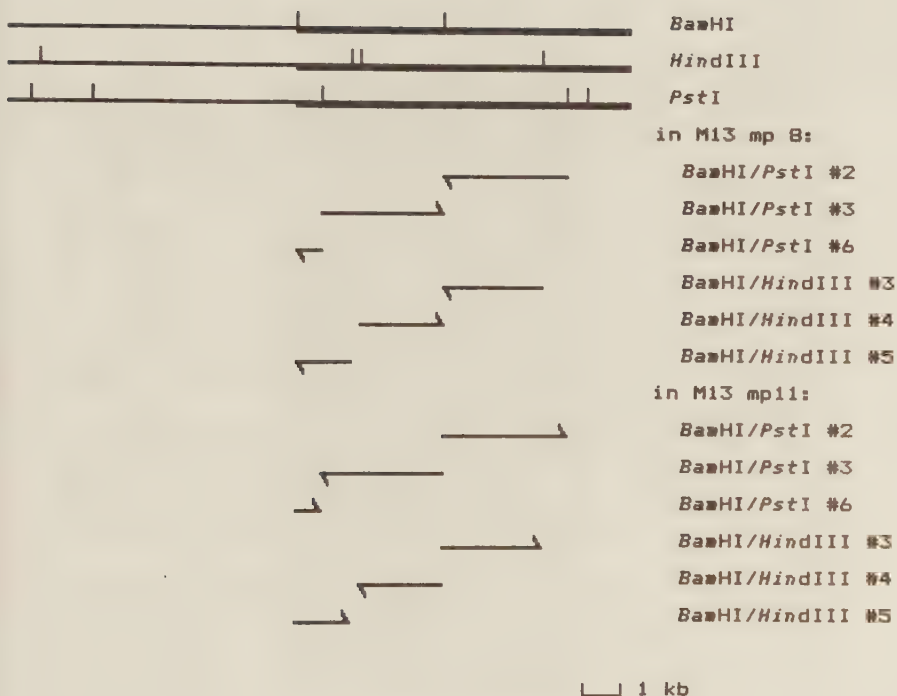


Abb.34: Orientierung der in Abb.31 charakterisierten FAS1 Fragmente in den M13 Vektoren mp8 und mp11

Die umklonierten pMS 3021 Fragmente sind entsprechend ihrer Lage relativ zu der Restriktionskarte von pMS 3021 dargestellt. Die Synthese des komplementären Strangs bei der DNA-Sequenzierung erfolgt vom universellen M13 Primer aus in Pfeilrichtung. Der obere Teil der Abbildung enthält eine Restriktionskarte von pMS 3021.

5.5 Konstruktion von verkürzten M13 Klonen mit Bcl31 Deletionen

Um weitere M13 Klone, vor allem aus dem Bereich des Transkriptionsstarts des *FAS1* Gens, zu erhalten, wurde von H. Köttig das *EcoRI* Fragment #2 (vgl. Abb.15) von pMS 3021 in einer solchen Orientierung in M13 mp11 eingebaut, daß bei Sequenzierung vom universellen M13 Primer aus (vgl. Abb.30) direkt die Sequenz des Sinnstrangs (entspricht der mRNA-Sequenz) erhalten wird.

Die DNA dieses M13 Klon, der die Benennung mp11 *Eco2+* erhalten hatte, wurde mit *SmaI* (vgl. Abb.30 bzgl. der Positionen von *EcoRI* und *SmaI* Schnittstellen) linearisiert und anschließend für unterschiedlich lange Zeitspannen mit der Exonuklease *Bcl31* behandelt. Das Ausmaß der dabei erzeugten Deletionen wurde durch Elektrophorese von aliquoten Teilen aus den zu verschiedenen Zeiten gestoppten Ansätzen ermittelt (Abb.35). Die von ursprünglich 11.7 kb auf 7 - 11 kb verkürzten Plasmid-DNA's wurden mit *EcoRI* nachgespalten und dadurch die einseitig verkürzten Folgeprodukte des ursprünglichen *FAS1 EcoRI* Fragmentes freigesetzt. Diese Fragmente wurden dann präparativ von den Vektor-Fragmenten in einem Agarose-Gel getrennt,, die gewünschten Fragmente durch Verflüssigung des Gels mit NaJ (s. Material und Methoden) aus der Agarose eluiert und schließlich in den mit *SmaI/EcoRI* gespaltenen Vektor M13 mp10 (vgl. Abb.30) eingebaut. In mp 10 liegt die *SmaI*-Schnittstelle, mit der sich die zum Teil glatten *Bcl31* Enden ligieren lassen, proximal zu der Bindungsstelle des universellen M13 Primers, sodaß die mit *Bcl31* verkürzten Fragmente von der, in jedem Fragment anderen, Deletionsstelle aus sequenziert werden können.

Nach Transformation von *E. coli* 71-18 mit dem Ligationsgemisch wurde die einzelsträngige Phagen-DNA der erhaltenen weißen Plaques isoliert und durch Agarose-Gel Elektrophorese analysiert. Wie Abb.36 zeigt, enthalten die isolierten M13 Klone DNA von sehr unterschiedlicher Größe. Dies ist der angestrebte Nachweis für das Vorliegen unterschiedlich großer inserierter Hefe-DNA Fragmente in ihnen.

Da die so konstruierten Klone die Hefe-DNA in der anderen Orientierung als in der Ausgangs DNA von mp11 *Eco2+* enthalten, kann die inserierte DNA - hinsichtlich Vorhandensein und Größe - durch Hybridisierung der einzelsträngigen DNA's der mp10-Klone und derjenigen des mp11 *Eco2+* Klon analysiert werden. Dabei werden nach Hybridisation der homologen Bereiche die überstehenden, nicht gepaarten DNA-Bereiche mit S1 Nuklease abgespalten (79) und die übrig bleibenden doppelsträngigen DNA-Fragmente durch Agarose-Gel Elektrophorese untersucht. Ein Beispiel für ein derartiges Experiment zeigt Abb.37: Es wurden die einzelsträngigen DNA verschiedener M13 mp10 Klone (*Bcl31* Deletionen) mit einzelsträngiger mp11 *Eco2+* DNA nach Kochen und langsamen Abkühlen zur Hybridisierung gebracht, dann mit der für Einzelstrangbereiche spezifischen Nuklease S1 die überstehenden unpaarigen Stränge abgebaut und die Länge der hybridisierten Region durch Agarose-Gel Elektrophorese der Proben festgestellt. In Abb.37 sind unter den 21 untersuchten Klonen 4, welche eindeutig ein in M13 eingebautes *FAS1* DNA-Fragment, jeweils unterschiedlicher Größe, enthalten. Wie aus der relativen Unschärfe der im Gel sichtbaren Banden hervorgeht, werden mit dieser Methode keine ganz einheitlichen Fragment-Größen erhalten; dies ist wohl auf die schwer zu optimierenden Bedingungen für Hybridisierung und Nuklease-Inkubation zurückzuführen. Durch diese S1-Analysen war es möglich, die für eine spätere DNA-Sequenzierung geeigneten Klone herauszusuchen (z.B. Nr.5, 12, 17 und 21 in Abb.37).

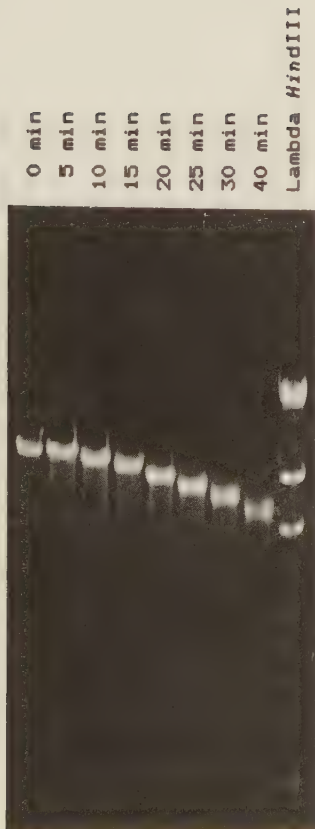


Abb.35: Kinetik der BaI31 Nuklease-Aktivität

85 Microgramm der doppelsträngigen Phagen-DNA des Klon's mp11 Eco2+ wurden nach Linearisierung mit 15 U SmaI in einem Volumen von 300 Microlitern mit 8 U BaI31 (BRL) bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 40 Microliter dem Verdauungsansatz entnommen, mit 1/10 Vol 0.2 M EGTA und anschließendem Erhitzen auf 60°C die Nuklease inaktiviert und je 5 Microliter in einem 0.8 % Agarose-Gel elektrophoresiert. Die Fragmente wurden mit EtBr angefärbt und unter UV-Beleuchtung photographiert.

Längen-Standard: Lambda-DNA HindIII.

# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11	# 12	# 13	M13 mp11	# 14	# 15	# 16	# 17	# 18	# 19	# 20	# 21
Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	M13 mp11	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon

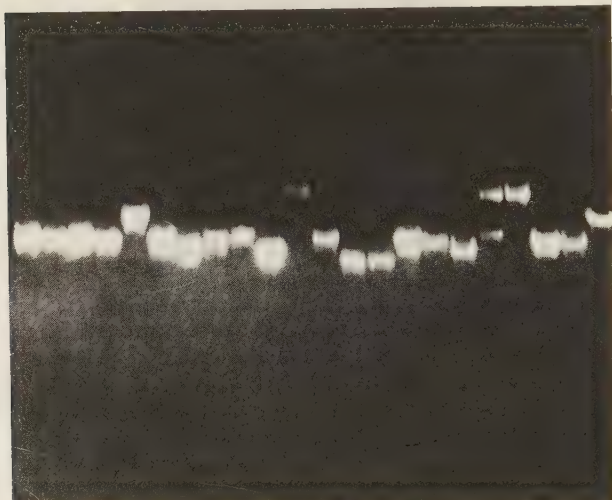


Abb.36: Elektrophoretische Analyse von einzelsträngiger DNA
rekombinanter M13 Phagen mit eingebauten
FAS1 Fragmenten

Die nach 10 - 40 min gestoppten *Ba131* Verdauungen (vgl. Abb.35) wurden vereinigt und nach Phenol-Extraktion und Äthanol-Fällung mit 20 U *EcoRI* nachgespalten. Die verkürzten *FAS1*-Fragmente wurden präparativ in einem 0.7 % Tris-Acetat Agarose-Gel (s. Material und Methoden) von dem M13 mp11 Vektor-Fragmenten getrennt und durch *NaJ* aus der Agarose gelöst. Dann wurden diese *EcoRI/Ba131*-Fragmente mit *SmaI/EcoRI* gespaltenen M13 mp10 DNA ligiert und mit dem Ligationsgemisch *E. coli* 71-18 transformiert. Aus den Phagen einiger weißer Plaques wurde die einzelsträngige DNA isoliert (s. Material und Methoden) und je 1 Microgramm der DNA-Präparationen in einem 0.8 % Tris-Acetat Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA's wurden mit EtBr gefärbt und unter UV-Beleuchtung fotografiert.

Als Kontrolle diente die einzelsträngige Phagen-DNA des Vektors M13 mp11.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	M13 mp11	14	15	16	17	18	19	20		
Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #		Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #	Klon #		
																					Klon #21	
																					Lambda DNA HindIII	
																					pMS 3021 HindIII	

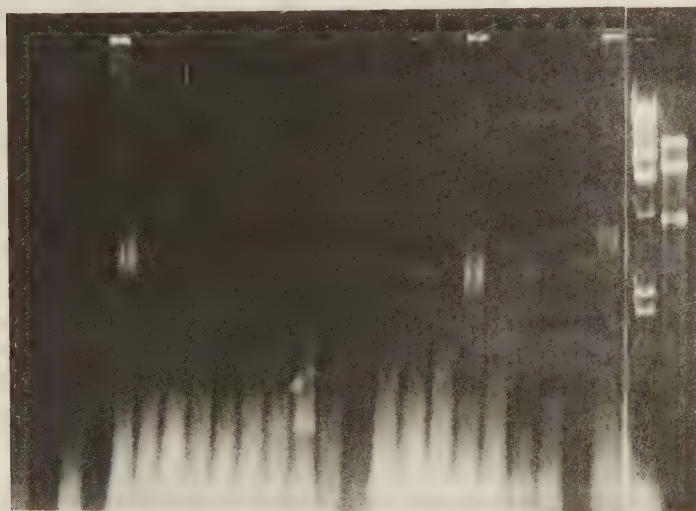


Abb.37: Untersuchung von einzelsträngiger Phagen-DNA durch Hybridisierung und S1 Nuklease-Behandlung

Je 2 Microgramm einzelsträngiger DNA der M13 Klone aus Abb.36 wurden mit 2 Microgramm der einzelsträngigen DNA des M13 Klon mp11 Eco2+ gemischt, 5 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert und in diesem dann langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Anschließend wurden die DNA's 30 min bei 37°C mit 0.3 U S1-Nuklease behandelt und in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA's wurden mit EtBr gefärbt und unter UV-Beleuchtung photographiert.

Größen Standard: Lambda-DNA HindIII und pMS 3021 HindIII.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

6. Molekulare Charakterisierung von FAS Transformanten DNA

S. cerevisiae Mutanten verschiedener Komplementationsgruppen der beiden Gene *FAS1* und *FAS2* waren von L. Roberts am hiesigen Institut durch klonierte *FAS*-DNA transformiert worden. Dabei zeigten die einzelnen *FAS* (Sub)Klone recht unterschiedliche Transformationsraten und waren gewöhnlich auch nicht in der Lage, Vertreter aller Komplementationsgruppen eines der beiden *FAS* Gene zu transformieren, sondern jeweils nur einen bestimmten Teil derselben. Nur Klone, die ein intaktes *FAS* Gen enthielten, wie etwa pMS 3021 (*FAS1*) oder pYc 1156 (*FAS2*) transformierten mit hoher Häufigkeit alle untersuchten Mutanten des jeweiligen *FAS* Gens. Theoretisch sollte nur in Transformanten dieses Typs die extrachromosomale Plasmid-DNA in der Mutantenzelle Komplementations-aktiv sein. Alle anderen, nur partielle *FAS* Gene enthaltenden Plasmide dürften nur nach Interaktion mit der chromosomalen *FAS*-DNA (Rekombination, Genkonversion) Transformations-aktiv sein. Die hier beobachteten niedrigen Transformationsraten stehen mit dieser Vorstellung in Einklang. In dieser Arbeit sollten durch molekulare Charakterisierung von Transformanten-DNA's der verschiedenen Typen die oben erwähnten Vorstellungen vom Transformationsmechanismus experimentell weiter erhärtet werden.

Um herauszufinden, in welcher molekularen Form die zur Hefe-Transformation eingesetzte *FAS*-DNA in den verschiedenen Transformanten vorlag und inwieweit sich die mit verschiedenen Subklon-DNA's erzeugten Transformanten voneinander unterschieden, wurde die Gesamt-DNA aus einer Reihe von Hefe-Transformanten isoliert und, entweder ungespalten oder mit *Cla*I (*FAS1*) bzw. *Xho*I (*FAS2*) gespalten, durch Southern-Hybridisierung untersucht. Als Hybridisierungsprobe diente dabei Nick-translatierte Vektor- (pBR 322) oder Plasmid-DNA (pMS 3021).

In Abb.38 - 40 sind einige Beispiele aus einer Vielzahl solcher Experimente zusammengefaßt. Abb.38 zeigt, daß in 7 von 8 untersuchten und mit pYc 1156 erzeugten Transformanten der *fas2* Mutante VI-3158 nur extrachromosomale, d.h. keine ins Genom integrierte Plasmid-DNA vorliegt. Da pYc 1156 das intakte *FAS2* Gen enthält (s.o.), ist dieser Befund nicht überraschend. Lediglich eine Transformante enthielt keine Plasmid-DNA und war möglicherweise durch Rekombination, Genkonversion oder aber durch Reversion entstanden. Abb.39 zeigt in entsprechender Weise eine Reihe von *FAS1* Transformanten, die mit intakter *FAS1*-DNA (pMS 3021) erzeugt worden waren. Hier enthielten 2 der 5 untersuchten Transformanten Plasmid-DNA Sequenzen, der Rest zeigte ein identisches Hybridisierungsmuster wie die Plasmid-freie Wildtypzelle. Es gilt dasselbe wie das oben zur Erklärung der *FAS2* Transformanten gesagt. Sowohl die erwähnten *FAS2* wie auch die *FAS1* Prototrophen waren immer dann mitotisch instabil - d.h. bei Teilungen unter nicht selektiven Bedingungen (in Fettsäure-haltigen Medien) können den Zellen die Plasmide verloren gehen -, wenn sie nachweislich ein *FAS* Plasmid enthielten. Dieses Verhalten war zu erwarten und spricht auch dafür, daß die Plasmid-DNA in den Transformanten 3410A-3021 und 2875A-3021 extrachromosomal vorliegt, was an sich aus Abb.39 nicht eindeutig hervorgeht.

Entsprechende Untersuchungen an Transformanten, die mit anderen FAS Plasmiden erzeugt worden waren, führten grundsätzlich zu denselben Ergebnissen. Auch hier wurden sowohl Plasmid-haltige (Abb.40b) wie Plasmid-freie (Abb.40c) Transformanten-Zellen nachgewiesen. Die Positionen der Plasmid-haltigen Restriktionsfragmente in den Hybridisierungsmustern der entsprechenden Transformanten-DNA's (Abb.40b) sind dieselben wie bei den jeweiligen gereinigten Plasmiden (Abb.40a). Lediglich die größere Intensität dieser Banden im Vergleich zu den chromosomalen hybridisierenden Fragmenten im Autoradiogramm (Abb.40b) läßt darauf schließen, daß die Plasmid-DNA nicht (nur) ins Genom integriert, sondern (auch) extrachromosomal in höherer Kopienzahl vorliegt. Im einzelnen zeigt Abb.40a die *Cla*I-Restriktionsmuster der verschiedenen zur Transformation eingesetzten Plasmide; in Abb.40b und c sind die Hybridisierungen daraus abgeleiteter, mit *Cla*I verdauter Transformanten-DNA's mit 32 P-markierter pMS 3021 DNA dargestellt. Wildtyp (SC9) DNA zeigt mit pMS 3021 sechs Hybridisierungsbanden, wobei das größte *Cla*I-Fragment offensichtlich das *TRP1/ARS1* Element aus *S. cerevisiae* enthält (Abb.40c, letzte Bahn). Zahl und Größe der übrigen mit pMS 3021 hybridisierenden *Cla*I-Fragmente aus Wildtyp-DNA stimmen - unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Nachbarsequenzen im Plasmid und Genom - mit der in Abb.15 gezeigten Restriktionskarte überein. Diesem Hybridisierungsmuster ist bei den in Abb.40b - nicht jedoch bei den in Abb.40c - gezeigten Transformanten jeweils eine weitere Bande überlagert (Pfeil). Dieses Fragment enthält die Vektor-DNA des transformierenden Plasmids (vgl. Abb.40a).

Durch Southern-Hybridisierung von ungespaltener Transformanten-DNA ließ sich zeigen, daß die hier benutzten Plasmide zu zwei Arten von Plasmid-haltigen FAS Transformanten führen: solchen, welche die Plasmid-DNA ausschließlich im Genom integriert enthalten (z.B. 3140C-3008 in Abb.40d) und anderen, bei welchen integrierte und freie Plasmid-DNA nebeneinander in der Zelle vorliegen (z.B. 3267A-3027 in Abb.40d). So sieht man bei der Transformante 3140C-3008 eine schwache Hybridisierungsbande in Höhe des Hauptteils der ungespaltenen Hefe-DNA. Bei 3267A-3027 dagegen zeigen sich neben einem möglicherweise entsprechenden Signal noch weitere Banden, die identisch mit den verschiedenen Formen (lineare DNA, offene Ringe, verdrehte Ringe, Multimere) unverdauter Plasmid-DNA sind (vgl. Abb.40c, zweite Bahn).

Durch Rückisolierung von Plasmid-DNA ('Rescue') aus der oben erwähnten Transformante 3267A-3027 konnte das gleichzeitige Vorliegen von extrachromosomaler und integrierter Plasmid-DNA eindeutig bewiesen werden (M. Schweizer).

E. coli Zellen wurden hierzu einmal mit unverdauter Transformanten-DNA, zum anderen mit derselben DNA, die zuvor mit *Eco*RI gespalten und dann wieder religiert worden war, transformiert. Durch Ampicillin-Selektion wurden Plasmid-haltige *E. coli* Klone isoliert und aus mehreren dieser Klone die Plasmid-DNA gereinigt. Die Restriktionsanalyse dieser Plasmid-DNA's ergab, daß aus Klonen, die durch Transformation mit ungespaltenen 3267A-3027 DNA hervorgegangen waren, nur unveränderte pMS 3027 Plasmide reisoliert wurden (Abb.41, pMS 3112), während aus den *E. coli* Zellen, welche durch Transformation mit *Eco*RI gespaltenen und religierten Hefe-DNA erhalten worden waren, zwei verschiedene Plasmide isoliert wurden: eines war offensichtlich durch *Eco*RI Spaltung und Religation eines in der Transformante 3267A-3027 enthaltenen extrachromosomalen Plasmids entstanden und hatte dabei das *TRP1/ARS1 Eco*RI Fragment verloren (Abb.41, pMS 3114). Die DNA eines anderen Plasmid-Typs war dagegen anscheinend durch *Eco*RI aus dem Hefe-Chromosom herausgeschnitten worden, hatte dabei zusätzliche, an die pMS 3027 FAS-DNA angrenzende Sequenzen

mitgenommen und in das neu entstandene Plasmid (Abb.41, pMS 3115) eingebaut. Ein Modell für diesen Vorgang ist in Abb.41c gezeigt.

Durch Hybridisierung mit dem *Bam*HI-Fragment #2 von pMS 3021 (entspricht Probe b in Abb.16c) wurde nachgewiesen, daß das 'Rescue' Plasmid authentische, auch im Genom zu *FAS1* kontinuierliche DNA enthält (Abb.41b).

Dieses Experiment zeigt eindeutig, daß in der gleichen Transformante nebeneinander selbstreplizierende, extrachromosomale Plasmide und ins Genom integrierte Plasmide vorliegen können. Nichtsdestoweniger waren Transformanten dieses Typs, ebenso wie die oben erwähnten pMS 3021 Transformanten, mitotisch instabil. Mitotisch stabil waren dagegen nur völlig Plasmid-freie *FAS* Prototrophe, d.h. nicht nur extrachromosomale sondern auch chromosomale Plasmid-DNA kann von den Hefezellen wieder relativ leicht verloren werden.

VI 56-1
VI 56-2
VI 56-5
VI 56-26
VI 56-32
VI 56-51
VI 56-58
VI 56-93
wild type
pYc 1156

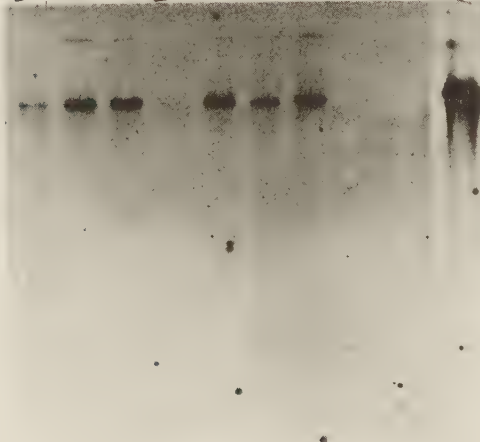


Abb.38: Southern-Analyse von Hefe-DNA aus
FAS2-Transformanten

Je 20 Microgramm Gesamt-DNA verschiedener Hefetransformanten, die durch Transformation der *fas2* Mutante VI-3158 mit klonierter FAS2-DNA (pYc 1156) erhalten worden waren, wurden mit *Xho*I restriktionsgespalten, ebenso DNA aus Wildtyphefe (SC9) und 3 Microgramm pYc 1156 Plasmid-DNA als Vergleich; pYc 1156 enthält nur eine *Xho*I-Schnittstelle. Die DNA's wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit 32 P-markierter pBR 322 DNA hybridisiert.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

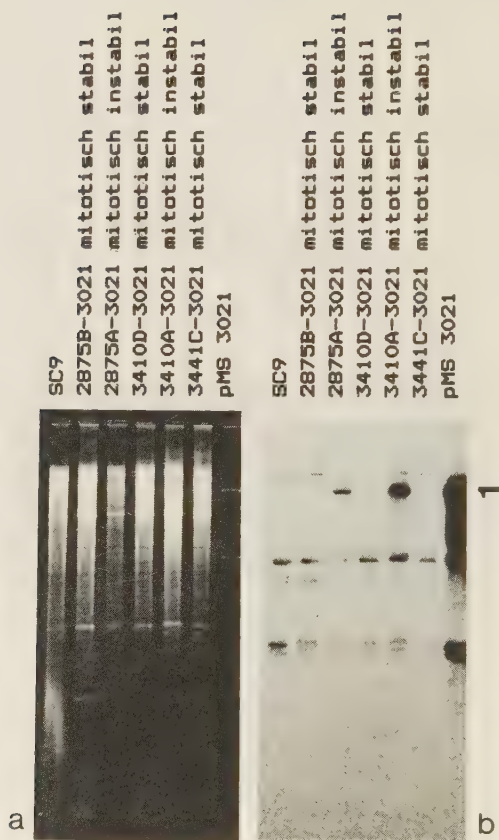


Abb.39: Restriktions- und Southern-Analyse von
FAS1 Transformanten-DNA's

Je 20 Microgramm Gesamt-DNA aus mitotisch stabilen und instabilen *FAS* prototrophen Hefeklonen, die durch Transformation der Hefemutanten *fasi*-2875, *fasi*-3410 und *fasi*-3441 mit pMS 3021 entstanden waren, wurden mit *Cla*I gespalten, in einem Agarose-Gel elektrophoresiert, das Spaltmuster mit EtBr gefärbt, unter UV-Beleuchtung photographiert (a) und die DNA's auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Der Filter wurde mit radioaktiv markierter pMS 3021 DNA hybridisiert (b). Der Pfeil markiert Vektor DNA-haltige Fragmente.

Als Kontrollen dienten Wildtyphefe-DNA (SC9) und pMS 3021, ebenfalls mit *Cla*I gespalten.

Die Bezeichnung der Transformanten erfolgte so, daß zuerst die Nummer der Hefemutante, dann ein Buchstabe für den Transformantenklon und, durch einen Bindestrich getrennt, die Bezeichnung des transformierenden Plasmids angegeben ist.

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

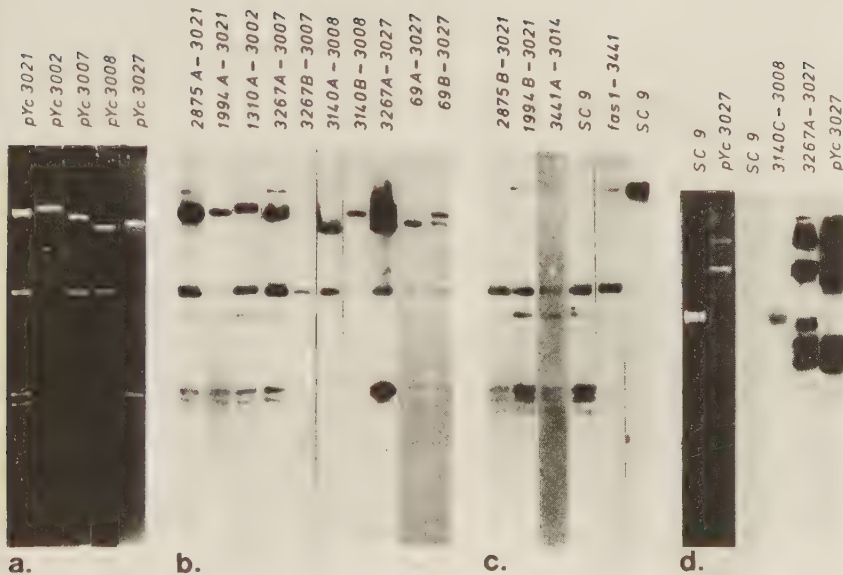


Abb.40: Charakterisierung verschiedener *FAS1* Hefe-
transformanten durch Southern-Hybridisierungen

(a) *ClnI* Restriktionsmuster verschiedener *FAS1* Plasmide.

(b, c) Je 20 Microgramm DNA von verschiedenen Hefetransformanten wurde mit *ClnI* gespalten, nach Elektrophorese auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit 32 P-markiertem pMS 3021 hybridisiert. Der letzte Streifen in (c) zeigt eine Hybridisierung zwischen einer *ClnI* Verdauung von Wildtyphefe-DNA und dem *TRP1/ARS1 EcoRI* Fragment des Vektors pMS 201.

Kontrollen: Wildtyphefe (SC9), vierte Bahn in (c); *fas1* Mutante 3441, fünfte Bahn in (c).

(d) Hybridisierungsmuster zweier ungespaltener Hefe-Transformanten DNA's mit 32 P markierter pBR 322 DNA.

Kontrollen: UV-Bild ungespaltener DNA von SC9, erste Bahn in (d); ungespaltene pMS 3027 DNA, zweite Bahn in (d); Southern-Hybridisierungen von SC9 und pMS 3027 mit pBR 322, dritte bzw. letzte Bahn in (d).

Der Pfeil markiert Vektor DNA-haltige Fragmente.

Die Bezeichnungen der verschiedenen Transformanten bestehen aus der Nummer der Mutante (z.B. 2875), des Klon (z.B. A) und der zur Transformation verwendeten DNA (z.B. 3021 für pMS 3021).

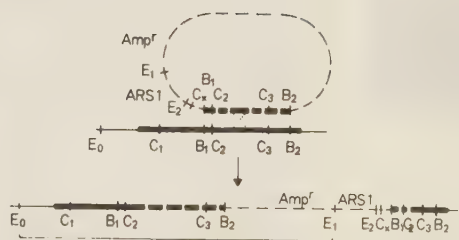
Die Bezeichnung der Plasmide 'pYc' wurde inzwischen für Subklone in 'pMS' geändert. Mit pYc werden nur noch Cosmide der ursprünglichen Genbank benannt.

pMS 3112 *Cla*I
 pMS 3114 *Cla*I
 pMS 3115 *Cla*I
 pMS 3027 *Cla*I
 pMS 3112 *Cla*I
 pMS 3114 *Cla*I
 pMS 3115 *Cla*I
 pMS 3027 *Cla*I



a

b



c

Abb.41: Restriktions- und Southern-Analyse von 'Rescue'
 Plasmiden nach Transformation von *fas1-3267*
 mit pMS 3027

Je 2 Microgramm der verschiedenen Plasmid-DNA's wurden mit *Cla*I gespalten, in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, nach EtBr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert (a), auf Nitrocellulose transferiert und mit dem ^{32}P markierten *Bae*HI-Fragment #2 von pMS 3021 (entspricht der Probe b in Abb.16c) hybridisiert (b).

(c) Schematisches Modell für die Integration des transformierenden Plasmids pMS 3027 in's Hefechromosom und Entstehung des 'Rescue' Plasmids durch *Eco*RI Spaltung und Religation.

E: *Eco*RI, C: *Cla*I, B: *Bae*HI Schnittstellen,
 dicke Striche: chromosomale *FAS1*-DNA, dick gestrichelt:
 klonierte *FAS1*-DNA in pMS 3027, dünne Striche: chromosomale
 Hefe-DNA, dünn gestrichelt: Vector-DNA mit Regionen für
 Ampicillin-Resistenz (*Amp*^r) und Replikation in Hefe (*ARS1*).

7. DNA-Sequenzierung des FAS1 Gens

Im Rahmen dieser Arbeit war ich, neben M. Schweizer, der die Sequenzierungsstrategie entwarf und selbst den Hauptteil der praktischen Sequenzierstätigkeit übernahm, sowie neben G. Müller, K. Takabayashi und H. Köttig an der DNA-Sequenzierung des FAS1 Gens nach der Dideoxynukleotid Terminations-Methode (s. Material und Methoden) beteiligt. Meine Aufgabe war die Herstellung von M13 Klonen mit subklonierter FAS1 DNA (s.o.), Mitarbeit beim eigentlichen Sequenziervorgang, beim Lesen der DNA-Sequenzen aus den autoradiographierten Gelen und bei der Auswertung und Bearbeitung der dabei anfallenden Daten mit dem Computer.

Die Herstellung der für die Sequenzierung geeigneten M13 Klone mit FAS1 Insertionen erfolgte nach drei verschiedenen, sich ergänzenden Methoden:

- 1) Durch Doppelspaltungen von pMS 3021 mit unterschiedlichen Kombinationen von Restriktionsendonukleasen und Einbau der erhaltenen FAS1 Fragmente in M13 Vektoren unterschiedlicher Polarität (z.B. mp8 und mp11, vgl. Abb.30) wurden ca. 50 verschiedene M13 Klone hergestellt (K. Takabayashi, G. Müller und diese Arbeit, s.S. 78ff.). Dabei können neben den nur einmal in der Polylinker-Region der M13 Vektoren schneidenden Restriktionsenzymen (vgl. Abb.30) auch solche Enzyme verwendet werden, die sich mit einer dieser Schnittstellen ligieren lassen. So können z.B. ClaI- mit AccI- und ebenso BglII- mit BamHI-Enden ligiert werden; diese Hybridrestriktionsstellen lassen sich allerdings mit keinem der beiden ursprünglichen Restriktionsenzyme wieder öffnen. Die so konstruierten Klone hatten den Vorteil, daß man von bekannten, bereits kartierten Restriktionsschnittstellen ausgehen und die jeweils erhaltenen Sequenzdaten mit der Restriktionskarte von pMS 3021 (Abb.15) in Beziehung bringen konnte.

- 2) Um die Sequenzierung von DNA-Bereichen zu ermöglichen, in denen keine für die unter (1) erwähnte direkte Klonierung geeigneten Restriktionsschnittstellen liegen, wurden von G. Müller Fragmente von pMS 3021 isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen, welche relativ häufig in FAS1 schneiden und deren Schnittstellen daher noch nicht kartiert worden waren (z.B. HaeIII, Sau3A, TaqI), nachgespalten. Die erhaltenen, kleinen FAS1 DNA-haltigen Fragmente wurden in den mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisierten Vektor M13 mp11 eingebaut und die nach Transformation von *E. coli* 71-18 erhaltenen, unterschiedlichen einzelsträngigen Phagen-DNA's sequenziert.

- 3) Einige M13 Klone mit relativ großen inserierten FAS1 Fragmenten, die einen noch nicht sequenzierten Bereich des FAS1 Gens überdeckten, z.B. der oben erwähnte Klon mp11 Eco2+, wurden durch unterschiedlich lange Behandlung mit Bal31 verkürzt und die so erhaltenen, verschieden langen Fragmente in den Vektor M13 mp10 umkloniert (H. Köttig und diese Arbeit, S.84ff.). Durch die Sequenzierung dieser Klone konnten noch vorhandene Lücken in der DNA-Sequenz des FAS1 Gens zum Teil geschlossen werden.

DNA-Sequenzen wurden gelegentlich auch mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide als Primer ermittelt. Von K. Takabayashi wurden diese Primer als Oligodesoxynukleotide von meist 14 Basen Länge nach der Phosphoramidit-Methode (80) hergestellt. Die Sequenz der Primer wurde aus dem Endbereich einer bekannten *FAS1* DNA-Teilsequenz gewählt, sodaß von den Primern aus neue, sich an die bereits bekannte Sequenz anschließende DNA-Sequenzen erhalten wurden. Diese Methode ist - wenn keine unvorhersehbaren Schwierigkeiten auftreten - wohl die beste, um gezielt kleine noch bestehende Lücken einer DNA-Sequenz zu schließen.

Die Lage und Richtung aller nach den oben beschriebenen Methoden für beide DNA-Einzelstränge erhaltenen Teilsequenzen ist in Abb.42b aufgeführt. Ihre Superposition erlaubt, die in Abb.42c schwarz gezeichneten Bereiche als durchgehend sequenziert anzugeben. Aufgrund der aus Abb.42b ersichtlichen häufig überlappenden, d.h. mehrfachen Sequenzierung beider Stränge können die Sequenzen der Bereiche A, C und D als gesichert gelten. Die sequenzierten Bereiche sind in Abb.42c maßstabsgetreu in Relation zur *FAS1* Restriktionskarte (Abb.42a) wiedergegeben. Aus der bekannten Transkriptionsrichtung des *FAS1* Gens (M. Schweizer, unveröffentlichte Ergebnisse, vgl. Abb.16b) ergibt sich, daß C am 5' Ende und D im Bereich des 3' Endes des *FAS1* Gens liegt.

Mit einem Computer-Programm wurden die Sequenzen auf das Vorhandensein offener Translations-Leserahmen untersucht. In Abb.43 sind alle sich ergebenden Leserahmen von mehr als 100 bp Länge in beiden DNA-Strängen und allen möglichen Rastern gezeigt. Man sieht, daß ein Leserahmen den ganzen sequenzierten Bereich C in Transkriptionsrichtung des *FAS1* Gens durchzieht, welcher im Bereich D für eine Strecke von 3388 bp fortgesetzt wird und mit einer Reihe von Translations Stop-Codons beendet wird. Außerdem ist bemerkenswert, daß sich auch in der Teilsequenz A ein durchgehender Leserahmen befindet. Andere, meist kleinere mögliche Leserahmen finden sich in allen Teilsequenzen und in beiden DNA-Strängen außer im Bereich B, dessen Sequenz allerdings noch nicht als sicher gelten kann.

Die DNA-Sequenzen der verschiedenen durchsequenzierten Teilbereiche der *FAS1* Genregion sind in Abb.44 - 49 aufgeführt. Es ist die Sequenz des DNA-Stranges wiedergegeben, welcher der *FAS1* mRNA entspricht (des 'Sinnstranges'). Für die Bereiche A, C und D wurde die resultierende Aminosäuresequenz mit angegeben. Das erste AUG-Codon in C - ein mögliches Translationsstart-Codon - ist gekennzeichnet, ebenso die Serie von Translationsstop-Codons am Ende von D.

Durch Vergleich der durch DNA-Sequenzierung erhaltenen Aminosäuresequenz der beta-Untereinheit von FAS mit den von Lynen et al. ermittelten Aminosäureteilsequenzen des aktiven Zentrums der Acetyl-Transferase und der Malonyl/Palmityl-Transferase (81) konnten beide FAS-Domänen im *FAS1* Gen lokalisiert werden (vgl. Abb.46, 50 und Abb.47, 51). Es zeigte sich dabei eine geringfügige Diskrepanz zwischen den Protein- und den DNA-Sequenzierungsdaten: die Reihenfolge von Threonin und Valin in der Acetyl-Transferase Teilsequenz ist in beiden Fällen unterschiedlich. Da wir die DNA-Sequenz mehrfach überprüft haben, dürfte es sich hier um den korrekteren Befund handeln. Die Anordnung und Reihenfolge der fünf verschiedenen funktionellen beta-Domänen innerhalb des *FAS1* Gen ist kürzlich von L. Roberts durch Transformation definierter *fasi* Hefemutanten mit subklonierter *FAS1* DNA bestimmt worden (s.o.). Bezüglich der erwähnten Transferase-Domänen stimmen die Sequenz- und Transformationsdaten überein.

Es wurden in der Proteinteilsequenz, die aus den sequenzierten DNA-Bereichen C und D für FAS erhalten wurde, die Häufigkeiten der verschiedenen Aminosäurecodons ermittelt. Dabei wurde vom Bereich C nur die Aminosäuresequenz ab dem ersten Methionin-Codon berücksichtigt, da dies möglicherweise das Start-Codon für die Translation des *FAS1* Gens ist (s. Diskussion). Die verschiedenen Codon-Häufigkeiten sind in Tabelle 5 aufgeführt und den Codon-Häufigkeiten anderer *S. cerevisiae* Gene gegenübergestellt. Der Vergleich zwischen den Codon-Häufigkeiten im *FAS1* Gen und in einer Reihe von sehr stark translatierten Hefe-Genen (*ADH*, *GPDH*, *CYC1* u.a.) zeigt eine vergleichbare Tendenz in der Bevorzugung mancher Codons gegenüber anderen. Allerdings ist diese Präferenz beim *FAS1* Gen nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen erwähnten Genen. Da sich die Stärke der Codon-Präferenz mit der Translationsrate des betreffenden Gens korrelieren läßt (92), kann man schließen, daß die Translationsrate von *FAS1* niedriger als die der anderen erwähnten Gene ist. Eine Analyse der Basenzusammensetzung des Sinnstranges des *FAS1* Gens ergab, daß dieser zu 30.1 % aus A, 30.1 % aus G, 19.8 % aus C und 20 % aus T zusammengesetzt ist, d.h. 60.2 % der Basen sind Purine.

Das von einem Computer-Programm ermittelte Hydrophilie-Profil des aus der bisherigen DNA-Sequenz (Bereiche C und D) erhaltenen Proteins ist in Abb.52 und Abb.53 gezeigt. Das Profil ist typisch für globuläre Proteine mit einem hohen Anteil alpha-helicaler Bereiche (103). Die durch Vergleich mit den Proteinteilsequenzen lokalisierten Domänen der Acetyl-Transferase und der Malonyl/Palmityl-Transferase sind in Abb. 52 und 53 durch Pfeile gekennzeichnet. Ansonsten lassen sich allein anhand dieser Computer-Graphik keine weiteren Hinweise auf die Struktur des Proteins erhalten. Wenn zu einem späteren Zeitpunkt die genauen Grenzen der verschiedenen funktionellen Domänen in der beta-Untereinheit der FAS bekannt sind, kann dieses Hydrophilieprofil zu Aussagen über die Lokalisation bestimmter Proteinbereiche im vollständigen Proteinkomplex der FAS herangezogen werden.

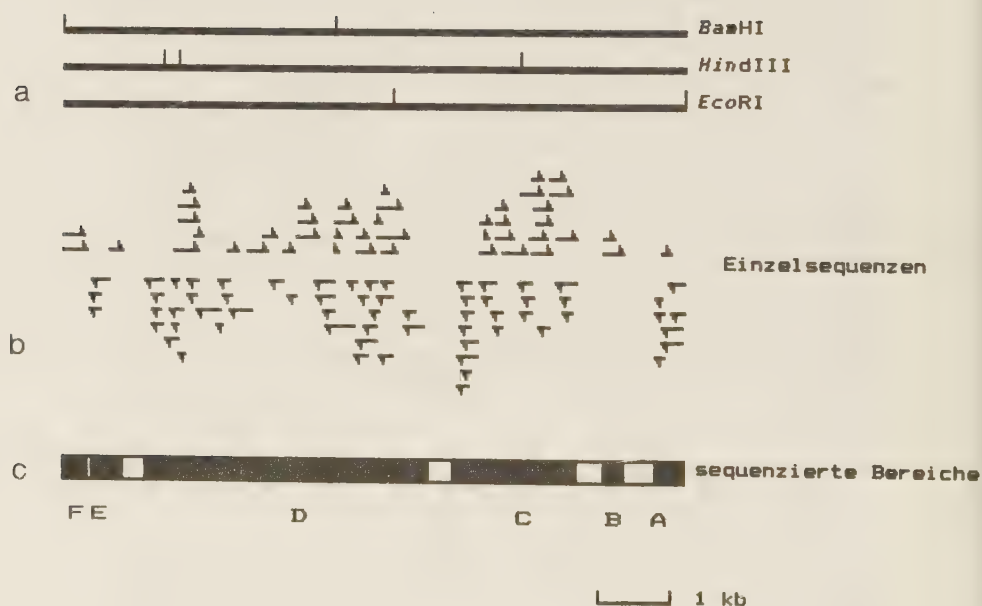


Abb.42: Strategie zur DNA-Sequenzierung des *FAS1* Gens

Die verschiedenen durch DNA-Sequenzierung ermittelten Teilsequenzen und ihre Richtung sind in (b) in Relation zur *FAS1* Restriktionskarte (a) dargestellt. Durch die Überlagerung der verschiedenen Teilsequenzen wurden die in (c) mit A - F markierten Sequenzbereiche erhalten. Die weißen Bereiche zwischen den einzelnen schwarzen Blöcken in (c) sind die noch verbliebenen nichtsequenzierten Regionen.

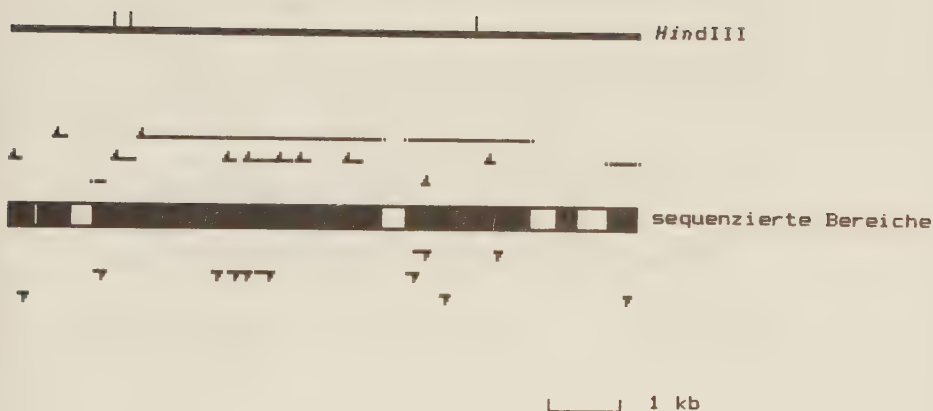


Abb.43: Leserahmen in der bisher ermittelten FAS1
DNA-Sequenz

In der Abbildung sind Länge und Richtung aller Leserahmen von >100 bp, die sich aus den bisher ermittelten DNA-Teilsequenzen des FAS1 Gens ergeben, in beiden DNA-Strängen und den 6 möglichen Rastern in Korrelation zur Restriktionskarte dargestellt. Die schwarzen Blöcke stellen die bisher erhaltenen Teilsequenzen A - F (vgl. Abb.42) dar.

Die Pfeilspitzen geben jeweils das Ende eines Leserahmens durch ein Translations-Stop Codon an.

Punkte am Ende einer Linie bedeuten, daß der Leserahmen über den darunter dargestellten durchsequenzierten Bereich hinausgeht.

TRANSLATION OF A

2

SER THR VAL PRO SER PRO CYS ALA VAL GLU LEU THR ILE ARG PRO LYS TYR SER ILE TYR
ABC ACA GTG CCT TCA CCG TGC GCA GTG GAA TTG ACT ATC AGG CCC AAA TAT TCA ATA TAC

62

ASP ARG HIS TYR ASN ASN GLU ILE GLU THR LEU PHE THR PHE GLU ASN PHE GLY VAL ASN
BAT CGC CAT TAT AAC AAC GAA ATC GAA ACC CTT TTC ACC TTC GAA AAC TTC GGC GTG AAC

122

ARG GLY ASP ASP LEU VAL ASN ASN CYS ASN GLU ALA LEU ALA VAL CYS MET ASP LEU HIS
AGG GGC GAT GAC CTG GTA AAC AAT TGT AAC GAA GCA CTA GCC GTA TGC ATG GAC CTG CAC

182

GLY GLU ASP VAL GLN ASP GLN ASP GLN GLU GLN TYR GLN ASP PRO SER MET ALA PHE GLU
GGT GAG GAC GTA CAA GAT CAA GAC CAG GAA CAA TAC CAA GAT CCA AGC ATG GCG TTT GAG

242

GLY ALA GLN ASP LEU ASN ALA THR TYR SER GLY LEU GLY ASP THR LEU HIS GLY PRO PRO
GGT GCG CAA GAT CTC AAC GCC ACG TAT TCT GGG CTT GGA GAC ACC CTT CAC GGG CCG CCC

302

VAL TYR GLN ASN ASP GLY LEU ALA ASP ASP LEU ASP GLY THR CYS TYR GLY GLN ALA SER
GTG TAT CAG AAC GAC GGG CTG GCA GAC GAT CTG GAT GGC ACC TGT TAT GGA CAG GCT TCG

362

SER LEU GLY VAL LEU
TCT CTA GGT GTC CTC

Abb.44: DNA-Sequenz des FAS1 Teilbereichs A

Es ist die Sequenz des der FAS1 mRNA entsprechenden DNA-Stranges wiedergegeben. Da A einen durchgehenden Leserahmen besitzt wurde die resultierende Aminosäuresequenz mit aufgeführt.

LISTING OF THE SEQUENCE

10	20	30	40	50	60	70	80
GAGGCCAAAACITACACTGCCGCCAGCAAGCATAATTACGCAACAGCGATCTTTCCGTCGCACAAGTTAAAGSAATTG							
90	100	110	120	130	140	150	160
TTGAAAAATACAATAATCGCGAACAATACGTTGTTGCTATTTAACGCTTTTGTCTGACAGTAAGTGTGCTTTCCCAA							
170	180	190	200	210	220	230	240
TCACCGAAAAGTGTGACGATTCACTGCGACAATAATCAGAGATTACAGTCGGCATTITGGCATTITGGCATACTTT							
250	260	270	280	290	300	310	320
TATCGATTGAACCATCTTCTCCAACACTTTTCCTTTTCTTCTATTCTGCA							

Abb.45: DNA-Sequenz des *FAS1* Teilbereichs B

Es ist die Sequenz des der *FAS1* mRNA entsprechenden DNA-Stranges wiedergegeben.

TRANSLATION OF C

1
ALA ASP ASP GLU PRO THR THR PRO ALA GLU LEU VAL GLY LYS PHE LEU GLY TYR VAL SER
GCA GAT GAC GAG CCT ACC ACA CCT GCT GAA CTA GTG GGG AAA TTC CTT GGC TAC GTA TCT

61
SER LEU VAL GLU PRO SER LYS VAL GLY GLN PHE ASP GLN VAL LEU ASN LEU CYS LEU THR
TCT CTA GTC GAA CCT TCC AAG GTC GGT CAA TTC GAT CAG GTC TTG AAC CTT TGC TTA ACA

121
GLU PHE GLU ASN CYS TYR LEU GLU GLY ASN ASP ILE HIS ALA LEU ALA ALA LYS LEU LEU
GAA TTT GAA AAC TGT TAT TTA GAA GGC AAT GAC ATT CAC GCC TTG GCT GCT AAA CTA TTA

181
GLN GLU ASN ASP THR THR LEU VAL LYS THR LYS GLU LEU ILE LYS ASN TYR ILE THR ALA
CAG GAA AAC GAC ACA ACT TTA GTG AAG ACT AAA GAA CTA ATT AAA AAT TAT ATT ACC GCC

241
ARG ILE MET ALA LYS ARG PRO PHE ASP LYS LYS SER ASN SER ALA LEU PHE ARG ALA VAL
AGA ATA ATG GCT AAG AGA CCA TTT GAC AAA AAA TCC AAC TCT GCT CTT TTT AAG GCC GTC

301
GLY GLU GLY ASN ALA GLN LEU VAL ALA ILE PHE GLY GLY GLN GLY ASN THR ASP ASP TYR
GGC GAG GGT AAC GCA CAA TTG GTA GCC ATT TTC GGT GGT CAA GGT AAC ACC GAC GAC TAC

361
PHE GLU GLU LEU ARG ASP LEU TYR GLN THR TYR HIS VAL LEU VAL GLY ASP LEU ILE LYS
TTT GAA GAA TTG CGT GAT CTA TAT CAA ACT TAT CAT GTC TTA GTG GGA GAT TTA ATC AAG

421
PHE SER ALA GLU THR LEU SER GLU LEU ILE ARG THR THR LEU ASP ALA GLU LYS VAL PHE
TTC TCC GCT GAA ACT TTA AGT GAA CTG ATT AGA ACT ACT TTA GAT GCT GAA AAA GTC TTT

481
THR GLN GLY LEU ASN ILE LEU GLU TRP LEU GLU ASN PRO SER ASN THR PRO ASP LYS ASP
ACT CAA GGT TTA AAC ATA TTG GAA TGG TTG GAG AAC CCT TCA AAT ACC CCA GAC AAG GAC

541
TYR LEU LEU SER ILE PRO ILE SER CYS PRO LEU ILE GLY VAL ILE GLN LEU ALA HIS TYR
TAT TTA CTT TCC ATT CCA ATT TCA TGC CCC TTA ATT GGT GTC ATT CAA TTG GCT CAC TAC

601
VAL VAL THR ALA LYS LEU LEU GLY PHE THR PRO GLY GLU LEU ARG SER TYR LEU LYS GLY
GTA GTT ACT GCC AAG CTT TTG GGT TTC ACT CCA GGT GAG TTA AGA TCT TAC TTA AAA GGT

661
ALA THR GLY HIS SER GLN GLY LEU VAL THR ALA VAL ALA ILE ALA GLU THR ASP SER TRP
GCT ACA GGT CAC TCT CAA GGT TTG GTT ACT GCT GTC GCC ATA GCT GAG ACG GAT TCC TGG

721
GLU SER PHE PHE VAL SER VAL ARG LYS ALA ILE THR VAL LEU PHE PHE ILE GLY VAL ARG
GAA TCC TTC TTC GTC TCC GTA AGA AAA GCA ATT ACT GTA TTA TTC TTC ATC GGT GTT CGT

Abb.46: DNA-Sequenz des *FAS1* Teilbereiches C

Es ist die Sequenz des der *FAS1* mRNA entsprechenden DNA-Stranges wiedergegeben. Da C einen durchgehenden Leserahmen besitzt, ist die resultierende Aminosäuresequenz mit angegeben.

Das AUG-Codon bei Koordinate 247 (Pfeil) wurde für die Feststellung der Codon-Häufigkeiten und für das Hydrophilieprofil (s.u.) als Translationsstart-Codon angenommen. Der schwarz umklammerte Sequenzbereich enthält die durch Aminosäuresequenzierung (81) identifizierte Sequenz des aktiven Zentrums der Acetyl-Transferase Domäne von Hefe-FAS.

TRANSLATION OF C

781

CYS TYR GLU ALA TYR PRO ASN THR SER LEU PRO PRO SER ILE LEU GLU ASP SER LEU GLU
TGT TAC GAA GCA TAC CCA AAC ACT TCC CTA CCA CCA TCC ATC TTG GAA GAT TCC TTG GAA

841

ASN ASN GLU GLY VAL PRO SER PRO MET LEU SER ILE SER ASN LEU THR GLN GLU GLN VAL
AAC AAT GAA GGT GTT CCA TCT CCA ATG TTG TCC ATT TCC AAT CTA ACT CAA GAA CAA GTT

901

GLN ASP TYR VAL ASN LYS THR ASN SER HIS LEU PRO ALA GLY LYS GLN VAL GLU ILE SER
CAA GAC TAT GTA AAT AAG ACT AAC TCT CAT TTG CCA GCT GGT AAA CAA GTT GAA ATT TCT

961

LEU VAL ASN GLY ALA LYS ASN LEU VAL VAL SER GLY PRO PRO GLN SER LEU TYR GLY LEU
CTA GTC AAT GGT GCG AAG AAT CTA GTC GTA TCG GGC CCA CCA CAA TCA TTA TAT GGT TTA

1021

ASN LEU THR LEU ARG LYS ALA LYS ALA PRO SER GLY LEU ASP GLN SER ARG ILE PRO PHE
AAC TTG ACT TTA AGA AAG GCC AAG GCC CCA TCT GGA CTG GAT CAA TCA AGA ATC CCA TTC

1081

SER GLU ARG LYS LEU LYS PHE SER ASN ARG PHE LEU PRO VAL ALA SER PRO PHE HIS SER
AGC GAA AGA AAA TTG AAG TTC TCC AAT AAG TTC TTA CCT GTT GCA TCA CCA TTC CAT TCC

1141

HIS LEU LEU VAL PRO ALA SER ASP LEU ILE ASN LYS ASP LEU VAL LYS ASN ASN VAL SER
CAT CTA TTG GTT CCA GCT TCA GAT TTG ATT AAC AAA GAC TTA GTC AAA AAC AAT GTC AGC

1201

PHE ASN ALA LYS ASP ILE GLN ILE PRO VAL TYR ASP THR PHE ASP GLY SER ASP LEU ARG
TTT AAC GCT AAA GAT ATT CAA ATC CCC GTT TAC GAC ACT TTT GAT GGT TCA GAT CTA AGA

1261

VAL LEU SER GLY SER ILE SER GLU ARG ILE VAL ASP CYS ILE ILE ARG LEU PRO VAL LYS
GTC CTT TCA GGT TCC ATT TCC GAG AGA ATC GTC GAC TGC ATC ATT AGA TTA CCT GTC AAA

1321

TRP GLU THR THR THR GLN PHE LYS ALA THR HIS ILE LEU ASP PHE GLY PRO GLY GLY ALA
TGG GAA ACT ACT ACA CAA TTC AAA GCC ACC CAC ATA TTA GAC TTT GGT CCA GGT GGA GCT

1381

SER GLY LEU GLY VAL LEU THR HIS ARG ASN LYS ASP GLY THR GLY VAL ARG VAL ILE VAL
TCC GGT TTA GGT GTT TTA ACC CAT CGT AAT AAA GAT GGT ACT GGT GTT CGT GTT ATC GTT

1441

ALA GLY THR LEU ASP ILE ASN PRO ASP ASP ASP TYR GLY PHE LYS GLN GLU ILE PHE ASP
GCC GGT ACT CTC GAC ATT AAC CCA GAT GAT GAT TAC GGA TTC AAG CAA GAA ATC TTT GAT

1501

VAL THR SER ASN GLY LEU LYS LYS ASN PRO ASN TRP LEU GLU GLU TYR HIS PRO LYS LEU
GTT ACT AGT AAT GGT TTG AAG AAA AAT CCA AAC TGG TTG GAA GAA TAC CAT CCA AAA TTA

1561

ILE LYS ASN LYS SER GLY LYS ILE PHE
ATT AAG AAC AAA TCA GGC AAA ATT TTT

TRANSLATION OF D

1
THR LEU LEU LYS ALA HIS PRO HIS PHE PRO ILE ALA LEU GLN TRP THR GLY GLY ARG GLY
ACA TTG CTT AAA GCA CAT CCA CAC TTC CCA ATA GCT TTA CAA TGG ACC GGT GGT AGA GGT

61
GLY GLY HIS HIS SER PHE GLU ASP ALA HIS THR PRO MET LEU GLN MET TYR SER LYS ILE
GGT GGT CAT CAT TCT TTC GAA GAT GGC CAC ACT CCA ATG TTA CAA ATG TAC TCC AAG ATT

121
ARG ARG HIS PRO ASN ILE MET LEU ILE PHE GLY SER GLY PHE GLY SER ALA ASP ASP THR
AGA AGA CAT CCA AAC ATT ATG TTG ATA TTC GGT TCT GGT TTC GGT TCT GCT GAT GAC ACT

181
TYR PRO TYR LEU THR GLY GLU TRP SER THR LYS PHE ASP TYR PRO PRO MET PRO PHE ASP
TAC CCA TAC TTA ACC GGT GAA TGG TCC ACA AAA TTC GAT TAT CCA CCA ATG CCA TTC GAT

241
GLY PHE LEU PHE GLY SER ARG VAL MET ILE ALA LYS GLU VAL LYS THR SER PRO ASP ALA
GGT TTC CTA TTT GGT TCG AAG GTC ATG ATT GCT AAG GAA GTT AAA ACT TCT CCT GAT GCT

301
LYS LYS CYS ILE ALA ALA CYS THR GLY VAL PRO ASP ASP LYS TRP GLU GLN THR TYR LYS
AAG AAG TGT ATT GCT GCT TGT ACT GGT GTT CCT GAT GAT AAA TGG GAA CAA ACC TAC AAG

361
LYS PRO THR GLY GLY ILE VAL THR VAL ARG SER GLU MET GLY GLU PRO ILE HIS LYS ILE
AAG CCA ACT GGT GGT ATT GTC ACT GTT CCG TCT GAA ATG GGT GAA CCA ATT CAC AAA ATT

421
ALA THR ARG GLY VAL MET LEU TRP LYS GLU PHE ASP GLU THR ILE PHE ASN LEU PRO LYS
GCC ACT CGT GGT GTT ATG CTA TGG AAG GAA TTC GAC GAA ACC ATC TTC AAC TTA CCA AAG

481
ASN LYS LEU VAL PRO THR LEU GLU ALA LYS ARG ASP TYR ILE ILE SER ARG LEU ASN ALA
AAT AAG TTG GTA CCA ACT TTG GAA GCA AAG AGA GAT TAC ATT ATC TCA AGA TTG AAC GCC

541
ASP PHE GLN LYS PRO TRP PHE ALA THR VAL ASN GLY GLN ALA ARG ASP LEU ALA THR MET
GAT TTC CAA AAA CCA TGG TTT GCT ACC GTC AAC GGT CAA GCC CGT GAC CTA GCC ACA ATG

601
THR TYR GLU GLU VAL ALA LYS ARG LEU VAL GLU LEU MET PHE ILE ARG SER THR ASN SER
ACA TAC GAA GAA GTT GCA AAG AGA TTG GTG GAA TTA ATG TTC ATC AGA TCT ACC AAC TCT

661
TRP PHE ASP VAL THR TRP ARG THR PHE THR GLY ASP PHE LEU ARG ARG VAL GLU GLU ARG
TGG TTT GAT GTC ACA TGG AGA ACC TTT ACT GGT GAT TTC CTA CGT CGT GTC GAA GAA CGT

721
PHE THR LYS SER LYS THR LEU SER LEU ILE GLN SER TYR SER LEU LEU ASP LYS PRO ASP
TTC ACT AAA AGT AAG ACA TTG TCT TTA ATC CAA TCC TAT TCT CTA CTA GAC AAG CCT GAT

Abb.47: DNA-Sequenz des FAS1 Teilbereiches D

Es ist die Sequenz des der FAS1 mRNA entsprechenden DNA-Stranges wiedergegeben. Da D einen langen durchgehenden Leserahmen enthält, ist die resultierende Aminosäuresequenz mit angegeben. Die am Ende der Sequenz im gleichen Raster liegenden Translationsstop-Codons sind durch '*' markiert; der schwarz umklammerte Sequenzbereich enthält die durch Aminosäuresequenzierung (81) identifizierte Sequenz des aktiven Zentrums der Malonyl/Palmityl-Transferase. Die zwei identischen Basenfolgen mit der Consensus-Sequenz des Hefe-Polyadenylierungssignals sind durch Striche gekennzeichnet.

TRANSLATION OF D

781

GLU ALA ILE GLU LYS VAL PHE ASN ALA TYR PRO ALA ALA ARG GLU GLN PHE LEU ASN ALA
GAA GCT ATT GAA AAA GTA TTT AAT GCT TAT CCT GCC GCT AGG GAA CAG TTC TTG AAT GCG

841

GLN ASP ILE ASP HIS PHE LEU SER MET CYS GLN ASN PRO MET GLN LYS PRO VAL PRO PHE
CAA GAT ATT GAT CAC TTT TTG AGC ATG TGT CAA AAT CCA ATG CAA AAA CCA GTG CCT TTT

901

VAL PRO VAL LEU ASP ARG ARG PHE GLU ILE PHE PHE LYS LYS ASP SER LEU TRP GLN SER
GTT CCA GTT TTG GAT CGT AGA TTC GAG ATT TTT TTC AAA AAA GAT TCG TTA TGG CAA TCT

961

GLU HIS LEU GLU ALA VAL VAL ASP GLN ASP VAL GLN ARG THR CYS ILE LEU HIS GLY PRO
GAG CAC TTG GAA GCC GTC GTC GAC CAA GAC GTT CAA AGA ACA TGT ATC CTA CAT GGA CCT

1021

VAL ALA ALA GLN PHE THR LYS VAL ILE ASP GLU PRO ILE LYS SER ILE MET ASP GLY ILE
GTT GCA GCA CAA TTC ACT AAA GTC ATC GAT GAA CCA ATT AAG AGC ATT ATG GAT GGT ATT

1081

HIS ASP GLY HIS ILE LYS LYS LEU LEU HIS GLN TYR TYR GLY ASP ASP GLU SER LYS ILE
CAC GAT GGT CAC ATC AAA AAG TTA CTA CAT CAA TAT TAC GGT GAC GAT GAG TCA AAG ATT

1141

PRO ALA VAL GLU TYR PHE GLY GLY GLU SER PRO VAL ASP VAL GLN SER GLN VAL ASP SER
CCA GCA GTT GAG TAC TTT GGT GGT GAA AGC CCT GTA GAC GTA CAA AGT CAA GTT GAT TCT

1201

SER SER VAL SER GLU ASP SER ALA VAL PHE LYS ALA THR SER SER THR ASP GLU GLU SER
TCC TCT GTA TCT GAA GAC TCA GCT GTT TTT AAG GCA ACA TCC TCT ACT GAT GAA GAA AGC

1261

TRP PHE LYS ALA LEU ALA GLY SER GLU ILE ASN TRP ARG HIS ALA SER PHE LEU CYS SER
TGG TTT AAG GCT TTG GCG GGA TCC GAA ATT AAC TGG AGA CAT GCA AGT TTC TTA TGT TCC

1321

PHE ILE THR GLN ASP LYS MET PHE VAL SER ASN PRO ILE ARG LYS VAL PHE LYS PRO SER
TTT ATC ACT CAA GAT AAA ATG TTT GTT TCT AAC CCA ATT AGA AAA GTT TTC AAG CCA AGC

1381

GLN GLY MET VAL VAL GLU ILE SER ASN GLY ASN THR SER SER LYS THR VAL VAL THR LEU
CAA GGA ATG GTT GTT GAG ATT TCC AAC GGC AAT ACT TCT TCA AAG ACT GTT GTC ACT CTT

1441

SER GLU PRO VAL GLN GLY GLU LEU LYS PRO THR VAL ILE LEU LYS LEU LEU LYS GLU ASN
TCA GAA CCT GTT CAA GGT GAA TTG AAA CCA ACT GTT ATT TTG AAG TTG TTG AAG GAG AAC

1501

ILE ILE GLN MET GLU MET ILE GLU ASN ARG THR MET ASP GLY LYS PRO VAL SER LEU PRO
ATA ATC CAA ATG GAA ATG ATT GAG AAC AGA ACT ATG GAT GGT AAG CCC GTC AGC TTG CCA

TRANSLATION OF D

1561

LEU LEU TYR ASN PHE ASN PRO ASP ASN GLY PHE ALA PRO ILE SER GLU VAL MET GLU ASP
TTG TTG TAC AAC TTC AAC CCA GAT AAT GGT TTT GCT CCA ATC TCT GAA GTT ATG GAG GAC

1621

ARG ASN GLN ARG ILE LYS GLU MET TYR TRP LYS LEU TRP ILE ASP GLU PRO PHE ASN LEU
AGA AAC CAA AGA ATT AAG GAA ATG TAC TGG AAA TTA TGG ATT GAT GAG CCT TTC AAT TTG

1681

ASP PHE ASP PRO ARG ASP VAL ILE LYS GLY LYS ASP PHE GLU ILE THR ALA LYS GLU VAL
GAC TTT GAC CCA AGA GAT GTC ATT AAG GGC AAA GAT TTC GAG ATC ACC GCT AAA GAA GTT

1741

TYR ASP PHE THR HIS ALA VAL GLY ASN ASN CYS GLU ASP PHE VAL SER ARG PRO ASP ARG
TAT GAC TTT ACA CAC GCT GTT GGA AAC AAT TGT GAA GAC TTC GTT TCT AGA CCT GAT AGA

1801

THR MET LEU ALA PRO MET ASP PHE ALA ILE VAL VAL GLY TRP ARG ALA ILE ILE LYS ALA
ACG ATG TTG GCC CCA ATG GAC TTT GCT ATT GTT GTC GGA TGG AGA GCC ATC ATC AAG GCC

1861

ILE PHE PRO ASN THR VAL ASP GLY ASP LEU LEU LYS LEU VAL HIS LEU SER ASN GLY TYR
ATT TTC CCT AAT ACG GTC GAT GGT GAC TTA TTG AAG TTG GTT CAT TTG TCT AAC GGC TAC

1921

LYS MET ILE PRO GLY ALA LYS PRO LEU GLN VAL GLY ASP VAL VAL SER THR THR ALA VAL
AAG ATG ATT CCT GGC GCT AAG CCA CTG CAA GTT GGT GAT GTT GTT TCA ACT ACT GCT GTT

1981

ILE GLU SER VAL VAL ASN GLN PRO THR GLY LYS ILE VAL ASP VAL VAL GLY THR LEU SER
ATT GAA TCT GTC GTC AAC CAA CCT ACA GGA AAG ATT GTC GAT GTG GTA GGT ACA TTA TCG

2041

ARG ASN GLY LYS PRO VAL MET GLU VAL THR SER SER PHE PHE TYR ARG GLY ASN TYR THR
AGA AAT GGC AAG CCT GTC ATG GAA GTC ACC TCC TCA TTC TTC TAC AGA GGC AAC TAT ACT

2101

ASP PHE GLU ASN THR PHE GLN LYS THR VAL GLU PRO VAL TYR GLN MET HIS ILE LYS THR
GAC TTT GAA AAC ACT TTC CAA AAG ACT GTT GAA CCT GTT TAT CAA ATG CAC ATC AAA ACT

2161

SER LYS ASP ILE ALA VAL LEU ARG SER LYS GLU TRP PHE GLN LEU ASP ASP GLU ASP PHE
TCT AAA GAT ATA GCT GTC TTG CAC TCT AAG GAG TGG TTC CAA TTG GAC GAT GAA GAC TTC

2221

ASP LEU LEU ASN LYS THR LEU THR PHE GLU THR GLU THR GLU VAL THR PHE LYS ASN ALA
GAT CTG TTA AAC AAA ACT TTG ACT TTC GAA ACT GAA ACT GAA GTT ACT TTC AAG AAT GCT

2281

ASN ILE PHE SER SER VAL LYS CYS PHE GLY PRO ILE LYS VAL GLU LEU PRO THR LYS GLU
AAC ATC TTC TCT TCA GTG AAA TGT TTT GGC CCA ATT AAA GTT GAA TTG CCA ACC AAA GAA

TRANSLATION OF D

2341

THR VAL GLU ILE GLY ILE VAL ASP TYR GLU ALA GLY ALA SER HIS GLY ASN PRO VAL VAL
ACC GTG GAG ATC GGT ATT GTC GAT TAC GAA GCC GGT GCC TCT CAC GGT AAC CCT GTT GTT

2401

ASP PHE LEU LYS ARG ASN GLY SER THR LEU GLU GLN LYS VAL ASN LEU GLU ASN PRO ILE
GAT TTC TTG AAG AGA AAC GGT TCC ACA TTG GAA CAA AAG GTC AAT CTA GAA AAT CCT ATT

2461

PRO ILE ALA VAL LEU ASP SER TYR THR PRO SER THR ASN GLU PRO TYR ALA ARG VAL SER
CCA ATT GCA GTA CTT GAT TCG TAC ACT CCA AGT ACC AAC GAA CCA TAC GCT AGA GTT TCT

2521

GLY HIS LEU ASN PRO ILE HIS VAL SER ARG HIS PHE ALA SER TYR ALA ASN LEU PRO GLY
GGT CAT TTG AAT CCA ATT CAC GTT TCA CGT CAT TTT GCC TCT TAC GCA AAC TTG CCA GGT

2581

THR ILE THR HIS GLY MET PHE SER SER ALA SER VAL ARG ALA LEU ILE GLU ASN TRP ALA
ACT ATC ACG CAC GGT ATG TTT TCT TCT GCT TCC GTC CGT GCT TTG ATT GAA AAC TGG GCT

2641

ALA ASP SER VAL SER SER ARG VAL ARG GLY TYR THR CYS GLN PHE VAL ASP MET VAL LEU
GCT GAC AGT GTT TCA TCC AGG GTA CGT GGC TAC ACT TGT CAA TTT GTT GAC ATG GTT TTG

2701

PRO ASN THR ALA LEU LYS THR SER ILE GLN HIS VAL GLY MET ILE ASN GLY ARG LYS LEU
CCT AAC ACT GCT TTG AAA ACA TCG ATT CAA CAT GTT GGT ATG ATC AAT GGT AGA AAA TTG

2761

ILE LYS PHE GLU THR ARG ASN GLU ASP ASP VAL VAL VAL LEU THR GLY GLU ALA GLU ILE
ATA AAG TTT GAA ACT AGA AAT GAA GAT SAC GTT GTA GTT TTG ACT GGT GAA GCC GAA ATT

2821

GLU GLN PRO VAL THR THR PHE VAL PHE THR GLY GLN GLY SER GLN GLU GLN GLY MET GLY
GAA CAA CCT GTT ACT ACC TTC GTT TTC ACT GGT CAA GGT TCA CAA GAA CAA GGT ATG GGT

2881

MET ASP LEU TYR LYS THR SER LYS ALA ALA GLN ASP VAL TRP ASN ARG ALA ASP ASN HIS
ATG GAC TTA TAC AAA ACT TCT AAA GCT GCT CAA GAT GTT TGG AAT AGA GCT GAC AAC CAT

2941

PHE LYS ASP THR TYR GLY PHE SER ILE LEU ASP ILE VAL ILE ASN ASN PRO VAL ASN LEU
TTC AAG GAC ACT TAT GGT TTC TCT ATC TTA GAC ATT GTC ATT AAC AAC CCA GTT AAC TTA

3001

THR ILE HIS PHE GLY GLY GLU LYS GLY LYS ARG ILE ARG GLU ASN TYR SER ALA MET ILE
ACA ATT CAC TTC GGT GGT GAA AAG GGT AAG AGG ATC AGA GAA AAC TAT TCT GCT ATG ATC

3061

PHE GLU THR ILE VAL ASP GLY LYS LEU LYS THR GLU LYS ILE PHE LYS GLU ILE ASN GLU
TTT GAG ACT ATC GTG GAT GGA AAA TTG AAG ACT GAA AAA ATT TTC AAG GAA ATT AAT GAG

3121
HIS SER THR SER TYR THR PHE ARG SER GLU LYS GLY LEU LEU SER ALA THR GLN PHE THR
CAA AGT ACT TCT TAC ACA TTT AGA TCT GAA AAA GGT TTA TTG TCT GCT ACT CAA TTT ACA

3181
GLN PRO ALA LEU THR LEU MET GLU LYS ALA ALA PHE GLU ASP LEU LYS SER LYS GLY LEU
CAA CCA GCT TTA ACT TTG ATG GAA AAA GCT GCT TTC GAA GAC TTG AAA TCT AAA GGT TTG

3241
ILE PRO ALA ASP ALA THR PHE ALA GLY HIS SER LEU GLY GLU TYR ALA ALA LEU ALA SER
ATC CCA GCC GAT GCT ACT TTT GCT GGT CAC TCT TTA GGT GAG TAT GCT GCT TTG GCC TCT

3301
LEU ALA ASP VAL MET SER ILE GLU SER LEU VAL GLU VAL VAL PHE TYR ARG GLY MET THR
TTG GCT GAT GTT ATG TCT ATC GAA TCT TTA GTT GAA GTT GTG TTC TAC AGA GGT ATG ACT

3361
MET GLN VAL ALA VAL PRO ARG GLU * GTTGGGAGATCCAATGATGATGATGCCATTAAACCCAGGT
ATG CAA GTT GCT GTT CCA AGA GAG TGA *

3431
AGAGTCGTCATCATTCTCTCAAGAAGCTTTGCAATATGTTGTTGAGAGAGTTGGTAAGAGAACCGGCTGGTTGGTTGA
* * * *

3511
AATCGTCAACTACACGTTGAAAACCAACAATATGTTGCAGCTGGTGTATCAAGAGCTTTAGACACCGTTACCAATGTTG

3591
TAAACTTCATCAAATTACAAAAATTGATATTATTGAACTACAAAAGTCTTATCTTTGGAAGAGTTGAAGGTCATTG

3671
TTTGAGATCATTTGACGAAGCTTTCCAGAAATCTGCTGTCAAGCCTCGCCCACTTAAATTGGAGAGAGTTTTGCTTGTA

371
TCCCATTAGTTGGTATTTCTGTTCTTTCCATTCCACCTACTTGATGATGGTGTAAACCATTCAAGAGTTTCTTGAAG

3831
AAGAATATCATAAAGAAAAATGTGAAGGTTGCTAGATTGSCCGGAAAGTACATTCCAACCTTGACTGCAACCATTTCCAG

3911
GTACTAAGGAATATTT

LISTING OF THE SEQUENCE

10	20	30	40	50	60	70	80
AGATTCTACCGTTTAATAGTCCTAATTTGAAGAGAAATAAAAATGCGTAAGTGTAAATTTTGTGTTGTAAGTCTCAGCC							
90	100	110	120	130	140	150	160
AGAGTTGGGTAAATATGTTTGCCAAGATTAGGTATCSAACCGCTCCATGTACATTAAAAAAATTTGCAATGGTGAAT							
170	180	190	200	210	220	230	240
CGTCAGTTCAAAATCAGGTATCTGTTGCGTACGAAGATGTGTATGTCATTCAATCTGGTTCTCCATCCATAAATGATGAC							
250	260	270	280	290	300	310	320
ATTATGGACTGTTGATTTTAAATTTCTGCTGTAGGG							

Abb.48: DNA-Sequenz des *FAS1* Teilbereichs E

Es ist die Sequenz des der *FAS1* mRNA entsprechenden DNA-Stranges wiedergegeben.

LISTING OF THE SEQUENCE

10	20	30	40	50	60	70	80
AGATGCACTAGTTGTCTCTAAGAATCGATAACCTATACGGGCTAGTTAGCGAATGATTAGAGAAATGTTGAGACTATGA							
90	100	110	120	130	140	150	160
AGATGAGTAGTTGTCTCTAAGAATCCAGGTGGTACTAAAAGAGATTACAGCCTGGCGGATTCTTTGAGATCAACTTTGCT							
170	180	190	200	210	220	230	240
ATGATCCATACTGATCGTCGTCTCTAAGGATCTGTATTCTCAAAACAAGGATTTGCAACAACATAAGTTGAGAAAGCA							
250	260	270	280	290	300	310	320
ATCAATGTTGAGGAAAAATAGCCGATCATCAGACAGGTGACCATCCAATGAGGAGGAAAACATTATTTTAAGTAACG							
330	340	350	360	370	380	390	400
TATTCAAACTGCTAGGATCC							

Abb.49: DNA-Sequenz des FAS I Teilbereichs F

Es ist die Sequenz des der FAS I mRNA entsprechenden DNA-Strangs wiedergegeben.

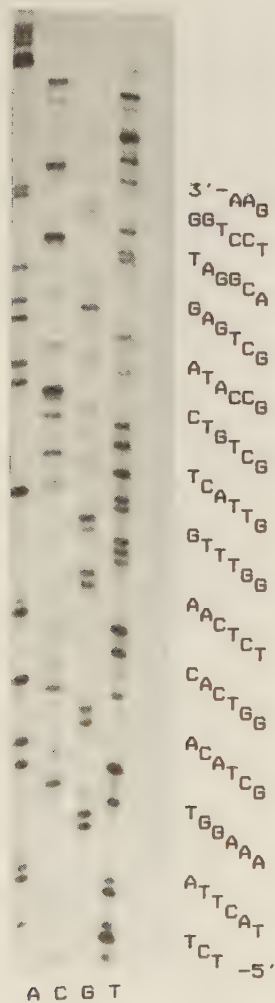


Abb.50: Sequenziergel mit der Sequenz des aktiven Zentrums der Acetyl-Transferase

Neben dem Autoradiogramm des Sequenziergels ist die daraus erhaltene DNA-Sequenz in 5'-> 3' Richtung (unten -> oben) gezeigt. Vgl. Abb.46.

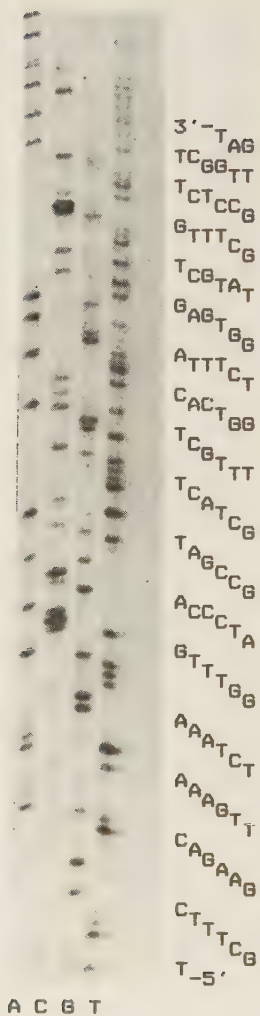


Abb.51: Sequenziergel mit der Sequenz des aktiven Zentrums der Malonyl/Palmityl-Transferase

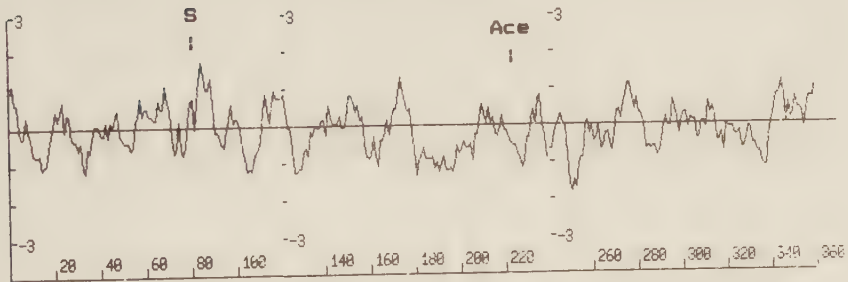
Neben dem Autoradiogramm des Sequenziergels ist die daraus erhaltene DNA-Sequenz in 5'-> 3' Richtung (unten -> oben) gezeigt. Vgl. Abb.47.

THESE ARE THE VALUES USED TO DETERMINE THE GRAPH.

1. ARG = 3.0000	2. ASP = 3.0000
3. GLU = 3.0000	4. LYS = 3.0000
5. SER = 0.3000	6. ASN = 0.2000
7. GLN = 0.2000	8. GLY = 0.0000
9. PRO = 0.0000	10. THR = -0.4000
11. ALA = -0.5000	12. HIS = -0.5000
13. CYS = -1.0000	14. MET = -1.3000
15. VAL = -1.5000	16. ILE = -1.8000
17. LEU = -1.8000	18. TYR = -2.3000
19. PHE = -2.5000	20. TRP = -3.4000

a

THE RUNNING AVERAGE IS TAKEN OVER 7 ACIDS.



b

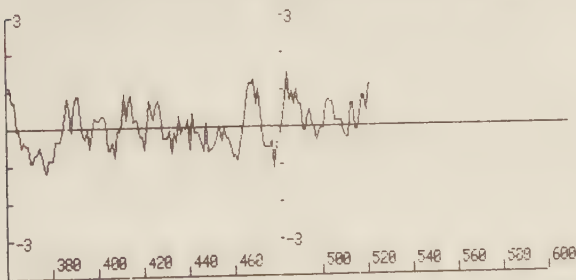


Abb.52: Hydrophilieprofil der aus Abb.46 für den Bereich C ermittelten Proteinsequenz

Das von einem Computerprogramm ermittelte Hydrophilieprofil (b) geht von den in (a) gezeigten Hydrophiliewerten der einzelnen Aminosäuren aus. Es wurde jeweils der Durchschnitt von 7 Aminosäureresten genommen.

S markiert den möglichen Translationsstart, Ace das aktive Zentrum der Acetyl-Transferase Domäne.

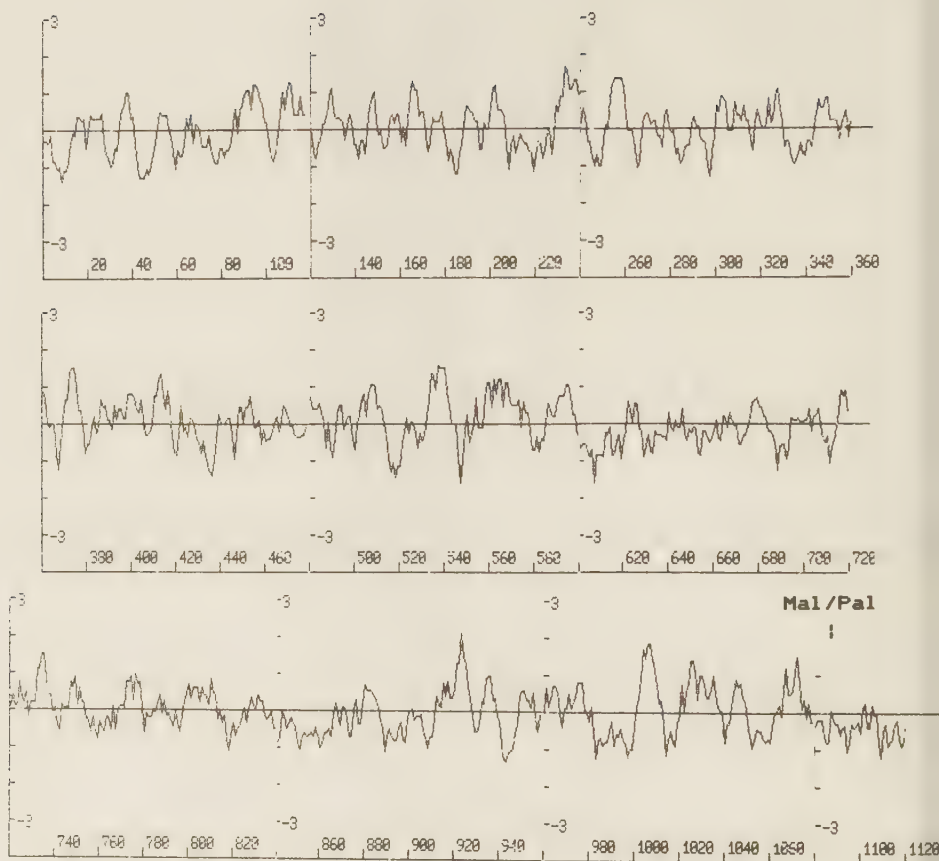


Abb.53: Hydrophilieprofil der aus Abb.47 für
den Bereich D ermittelten Proteinsequenz

Das gezeigte Hydrophilieprofil geht von den in Abb.52a aufgeführten Werten für die einzelnen Aminosäuren aus. Es wurde jeweils der Durchschnitt von 7 Aminosäureresten genommen.

Der Bereich des aktiven Zentrums der Malonyl/Palmityl-Transferase ist mit Mal/Pal bezeichnet.

Tabelle 5: Codon-Häufigkeiten im FAS1 Gen

Die Häufigkeiten der verschiedenen Codons für die einzelnen Aminosäuren wurden aus der in Abb.46 und 47 gezeigten DNA- und der aus ihr abgeleiteten Protein-Sequenz ermittelt. Es sind die Daten von 1573 Aminosäuren erfaßt.

Zum Vergleich sind die Daten aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase Gen (GDH) (82), dem Alkohol Dehydrogenase I Gen (ADH) (83) von *S. cerevisiae* und die aus (84) erhaltenen Werte für häufig translatierte Hefe-Gene (Y) mit aufgeführt.

		Codon-Häufigkeiten						Codon-Häufigkeiten			
AS	Codon	FAS1	GDH	ADH	Y	AS	Codon	FAS1	GDH	ADH	Y
(insg.)						(insg.)					
Phe	TTT	36	-	-	5	Tyr	TAT	15	-	-	2
	(90) TTC	54	10	8	63		(43) TAC	28	10	13	73
Leu	TTA	40	-	2	14		TAA	-	-	-	-
	(128) TTG	61	21	19	148		TAG	-	-	-	-
	CTT	6	-	-	-	His	CAT	18	-	1	3
	CTC	1	-	-	1		(36) CAC	18	8	10	56
	CTA	16	-	3	6	Gln	CAA	53	5	9	44
	CTG	4	-	-	-		(54) CAG	1	-	-	-
Ile	ATT	57	9	9	58	Asn	AAT	29	-	-	3
	(98) ATC	33	11	12	66		(75) AAC	46	12	11	86
	ATA	8	-	-	1	Lys	AAA	52	1	4	21
Met	ATG	36	6	7	39		(106) AAG	54	25	20	151
	(36)					Asp	GAT	57	8	2	37
Val	GTT	67	22	19	112		(96) GAC	39	17	14	100
	(126) GTC	36	15	17	93	Glu	BAA	78	14	20	67
	GTA	15	-	-	3		(99) GAG	21	-	-	3
	GTG	8	-	-	1	Cys	TGT	9	2	8	20
Ser	TCT	45	13	14	79		(11) TGC	2	-	-	2
	(117) TCC	29	12	7	73	Trp	TGG	20	3	5	26
	TCA	20	-	-	1		(20)				
	TCG	7	-	-	1	Arg	CGT	13	-	-	2
	AGT	8	-	-	1		(61) CGC	2	-	-	-
	AGC	8	-	-	1		CGA	-	-	-	-
Pro	CCT	22	-	2	6		CGG	-	-	-	-
	(83) CCC	3	-	1	1		AGA	40	11	8	63
	CCA	58	12	10	71		AGG	6	-	-	1
	CCG	-	-	-	-	Gly	GGT	77	25	41	164
Thr	ACT	65	12	5	49		(99) GGC	11	-	3	11
	(102) ACC	16	12	9	66		GGA	11	-	-	1
	ACA	17	-	-	-		GGG	-	-	-	1
	ACG	4	-	-	-						
Ala	GCT	52	26	19	182						
	(93) GCC	24	6	16	62						
	GCA	14	-	-	3						
	GCG	3	-	-	4						

IV. DISKUSSION

Unsere Arbeitsgruppe hat bisher etwa 90 % der Sequenz des *FAS1* Gens der Hefe *S. cerevisiae* ermittelt. Dabei konnten die aktiven Zentren der Malonyl/Palmityl-Transferase und der Acetyl-Transferase Domänen innerhalb des sequenzierten Bereichs dieses Gens identifiziert werden. Die Lokalisation und Reihenfolge der fünf beta-Domänen im *FAS1* Gen wurden gleichzeitig von anderen Mitarbeitern des Instituts durch Transformation geeigneter *fas1* Mutanten mit einer Vielzahl verschiedener *FAS1* DNA Subklone festgestellt (L. Roberts, B. Hoffmann, E. Höllner, unveröffentlichte Ergebnisse). Damit ergibt sich folgendes Bild für die *FAS1* Genstruktur (Abb.54): am nächsten zum Amino-Ende des Proteins liegt die Acetyl-Transferase Domäne, gefolgt von der Enoylreduktase Domäne. Am Carboxyl-Ende der beta-Untereinheit wurde die Malonyl/Palmityl-Transferase Domäne lokalisiert; zwischen dieser und der Enoylreduktase Domäne liegt die Dehydratase Domäne. Die Transformationsdaten erlauben noch weitergehende Aussagen: So stoßen die Dehydratase und Malonyl/Palmityl-Transferase Domänen fast lückenlos aneinander. Dagegen liegen zwischen der Dehydratase und der Enoylreduktase Domäne ebenso wie zwischen der letzteren und der Acetyl-Transferase Domäne größere DNA-Bereiche, in welchen keine der von uns untersuchten *fas1* Mutationen vorkommen - weder spezifische noch pleiotrope. Das bedeutet, daß Mutationen in diesen Bereichen offenbar keine phänotypischen Auswirkungen auf die Enzymfunktion haben. Geht man davon aus, daß es sich bei diesen Sequenzen nicht um Introns handelt, so könnten derartige Mutations-unempfindliche Bereiche speziell durch die zwischen den einzelnen Domänen liegenden Peptidketten verkörpert werden. Schließlich ist es auch denkbar, daß die bisher untersuchten Mutanten (38 Stück) aus rein statistischen Gründen noch keine repräsentative Auswahl darstellen.

Jedenfalls können den verschiedenen funktionellen Domänen der *FAS* beta-Untereinheit eindeutig bestimmte DNA-Bereiche zugeordnet werden. Dies war nicht von vorneherein selbstverständlich, da die funktionellen Zentren von Enzymen grundsätzlich auch durch die Zusammenlagerung von weit auseinanderliegenden Sequenzbereichen einer Proteinkette bei deren Rückfaltung entstehen könnten. Die Übertragung des Begriffs der 'Domäne' von Protein- auf DNA-Ebene ist in letzterem Fall nicht möglich. Bei dem *FAS1* Gen der Hefe dagegen erscheint sie berechtigt.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit bedarf noch der Klärung. Für das Vorhandensein von Introns im *FAS1* Gen gibt es zwar bis jetzt keine Hinweise, man kann ihr Vorkommen aber auch noch nicht mit Sicherheit ausschließen. Begegnung mit Introns im *FAS1* Gen spricht,

a) daß in der bisher ermittelten DNA-Sequenz keine der für Intron-haltige *S. cerevisiae* Gene charakteristischen Konsensus-Sequenzen ('TACTAAC') (85) vorkommen;

b) daß die Länge des DNA-Bereichs, der mit der *FAS1* mRNA hybridisiert nicht wesentlich größer ist als die *FAS1* mRNA selbst (was zumindest bei größeren Introns im Gen der Fall sein sollte);

c) daß in *rna1* und *rna2* Hefemutanten keine Vorstufen der reifen *FAS1* mRNA entdeckt werden konnten;

d) daß Elektronenmikroskopie-Studien bisher keine Hinweise auf Introns im *FAS1* Gen lieferten;

e) daß eine Restriktionskartierung von drei verschiedenen *FAS1* cDNA Klonen dasselbe Restriktionsmuster wie die entsprechende genomische *FAS1* DNA zeigte.

Nichtsdestoweniger müssen die Ergebnisse der zur Zeit noch laufenden Experimente, wie die vollständige Sequenzierung des *FAS1* Gens oder auch die S1 Nuklease Behandlung von DNA/mRNA-Hybriden abgewartet werden, um abschließende Aussagen zu diesem Punkt machen zu können. Schließlich muß auch die Möglichkeit des Vorkommens sehr kleiner Introns, die dadurch einer Entdeckung mit den oben beschriebenen Methoden bisher entgangen sind, im Auge behalten werden.

Zur bisher ermittelten DNA-Sequenz läßt sich bemerken, daß vorläufig noch nicht das Translations-Startcodon gefunden wurde. Das in Abb.46 markierte ATG-Codon ist zwar ein Kandidat dafür, aber solange die DNA-Sequenz noch nicht vollständig bekannt und die oben erwähnte S1 Nuklease Kartierung nicht abgeschlossen ist, muß diese Frage offen bleiben. Nimmt man das erwähnte ATG-Codon im Bereich C (vgl. Abb.42) als hypothetisches Start-Codon für die Translation der beta-Untereinheit an, so erhält man durch Addition der Molekulargewichte der Peptidketten, welche sich aus den Bereichen C und D ableiten, einen Wert von ca. 176 000 Daltons. Die Lücke zwischen den DNA-Bereichen C und D ist etwa 390 bp, entsprechend 130 Aminosäuren groß. Setzt man als durchschnittliches MW einer Aminosäure 112 Daltons ein und addiert den sich daraus für dieses 'Lückenpeptid' ergebenden Wert von 14 500 Daltons zu dem oben genannten Wert, so ergibt sich ein Molekulargewicht von ca. 190 000 Daltons für die FAS beta-Untereinheit. Dieser errechnete Wert liegt zwischen den durch SDS-Gelelektrophorese ermittelten Werten von 180 000 Daltons (86) und 200 000 Daltons (87). Falls das *FAS1* Gen also tatsächlich keine Introns enthält und falls der Fehlerbereich bei der elektrophoretischen Bestimmung des Molekulargewichts nicht größer als 10 % war, dann ist es durchaus möglich, daß das erwähnte ATG-Codon das Start-Codon des *FAS1* Gens ist.

Dafür spricht außerdem, daß die Sequenzen in der Umgebung dieses ATG-Codons in den folgenden Eigenschaften mit Startregionen anderer Hefe-Gene (104) übereinstimmen: in Position -3 (das A des ATG-Codons wird als +1 bezeichnet) befindet sich ein A, in Position +4 ein G und in Position +6 ein T (vgl. Abb.46). Dieses T in Position +6 ist typisch für relativ stark transkribierte Hefe-Gene (105).

Vor diesem ATG-Triplett liegt, zwischen den Positionen -29 und -11, eine nur aus A und T bestehende Sequenz von 18 bp, welche zwei TATA-ähnliche Basenfolgen enthält. Zusätzlich findet sich bei Position -71 die Sequenz TATTA und bei -111 die Sequenz TATTTA, welche ebenfalls als Erkennungsstellen der eukaryotischen RNA-Polymerase II in Frage kommen. Eine derartige Häufung TATA-ähnlicher Sequenzen findet sich sonst nirgends in den Sequenzbereichen C und D (vgl. Abb.42). Im Sinnstrang des Bereichs C liegt noch eine TATA-Sequenz ca. 100 bp vor dem nächsten ATG-Codon (Position 758 bzw. 865 in Abb.46). Allerdings liegt dieses ATG-Triplett hinter der identifizierten Sequenz des aktiven Zentrums der Acetyl-Transferase Domäne und kommt somit als Translations Start-Codon nicht in Betracht. Generell läßt sich zur Verteilung von TATA-ähnlichen Sequenzen in beiden Strängen der *FAS1*-Teilsequenzen C und D sagen, daß im Gegenstrang von C vier und in beiden Strängen von D vier bzw. fünf TATA-ähnliche Sequenzen liegen und somit in einem statistischen Abstand von 300 - 400 bp (Bereich C) bzw. 800 - 1000 bp (Bereich D) in den von uns untersuchten *FAS1* DNA-Sequenzen vorkommen. Danach könnte den erwähnten mehrfachen TATA-Sequenzen im Anfangsbereich von C durchaus eine gewisse Signifikanz zugesprochen werden. Ebenfalls befindet sich am Anfang von C (Position -100 in Abb.46) eine CAAT-Sequenz, die in einigen eukaryotischen Genen ca. 80 bp vor dem Transkriptionsstart (106), allerdings bei Hefe-Genen bisher nur selten gefunden wurde (104). Vor dem hypothetischen Start-Codon wurden im Bereich C keine der im 5'-Bereich anderer Hefe-Gene als regulatorische Sequenzen

definierten Nukleotidfolgen gefunden: Weder liegt kurz vor dem ATG-Triplett die Sequenz 'CACACA', welche bei mehreren Genen glykolytischer Enzyme (107), einem Gen für das Histon H2B (108) und dem *TRP1*-Gen (109) identifiziert wurden, noch wurde ein Pyrimidin-reicher Sequenz-Block oder die Sequenz 'CT-CAAG' im Anfangsbereich der *FAS1*-Teilsequenz C entdeckt, Sequenzen denen bei verschiedenen Hefe-Genen Regulationsfunktionen zugesprochen werden (104, 110). Auch konnte keine zum 3'-Ende der 18S ribosomalen Hefe-RNA komplementäre Sequenz gefunden werden, wie dies in einigen Fällen auch bei Hefe-Gentranskripten diskutiert wurde (111).

Am 3'-Ende des Gens liegen eine Serie von Translationsstop-Codons. Es wurde in diesem Bereich keine Konsensus-Sequenzen ('AATAAA') der Polyadenylierung gefunden. Diese Sequenz tritt allerdings bei *S. cerevisiae* Genen bisher nur in wenigen Fällen als Polyadenylierungssignal auf; meist wurden andere, nicht oder nur entfernt mit der 'AATAAA' Konsensus-Sequenz verwandte Sequenzen als Polyadenylierungssignale identifiziert. Von Zaret und Sherman (112) wurde durch Vergleich der 3'-Enden von 15 Hefe-Genen und durch Deletions-Experimente eine für Hefe mRNA's als Polyadenylierungssignal gültige Consensus-Sequenz definiert (TATGT-TTT). 77 und 152 Nukleotide nach dem Translations Stop-Codon des *FAS1*-Gens befinden sich zwei direkte Kopien der Sequenz 'CAATATGTTG' (markiert in Abb.47, S.108) gefolgt von drei T's. Diese Sequenzen stimmen mit der Consensus-Sequenz überein und stellen demnach sehr wahrscheinlich das Polyadenylierungssignal der *FAS1* mRNA dar. Das genaue Ende der *FAS1* mRNA wird gegenwärtig durch S1 Nuklease Studien bestimmt. Ebenso wird dieses Ende durch Sequenzierung der oben erwähnten cDNA Klone untersucht.

Die aus den Sequenzdaten erhaltenen Codon-Häufigkeiten im *FAS1* Gen (vgl. Tab.5) lassen den Schluß zu (92), daß das *FAS1* Gen eher zu den mit durchschnittlicher Häufigkeit translatierten Genen der Hefe gehört. Aufgrund der besonderen Größe der *FAS* beta-Untereinheit sind die gemessenen Codon-Häufigkeiten von besonderer Aussagekraft, da die bisher aufgestellten Tabellen auf den für relativ kleine Hefe-Proteine ermittelten Daten beruhen. So ist z.B. der Befund, daß bestimmte Codons überhaupt nicht benutzt werden, für ein Gen von 4,7 kb aussagekräftiger als für ein Gen von nur 1 kb, in dem schon rein statistisch manche Codons fehlen können.

Wenngleich die aus den vorhandenen Sequenzdaten ableitbare Aminosäurezusammensetzung der beta-Untereinheit noch lückenhaft ist, so stimmt sie doch jetzt schon gut mit der von F. Wieland (93) proteinchemisch erhaltenen Aminosäurezusammensetzung überein.

Die Technik der Oligodidesoxynucleotid Terminations-Methode nach Sanger (63, 65) wurde von uns aus mehreren Gründen der chemischen DNA-Sequenzierungsmethode nach Maxam und Gilbert (94, 95) vorgezogen: Zum einen ist der zeitliche Aufwand für den eigentlichen Sequenzierungsvorgang bei der Sanger'schen Methode bedeutend geringer. Das Ergebnis ist bereits nach 8 - 12 h sichtbar, da die einzelnen Fragmente durchgehend und damit stärker radioaktiv markiert sind als bei der chemischen Methode, wo nur das endständige Nukleotid der einzelnen Fragmente radioaktiv ist. Generell ist die chemische Methode wesentlich komplizierter und damit auch für Fehler anfälliger als die Terminations-Methode.

Das Hauptproblem bei der Sanger'schen Methode ist die Klonierung der zu sequenzierenden Fragmente. So sind gelegentlich auftretende Schwierigkeiten beim Sequenzieren unserer Erfahrung nach stets auf die eingesetzte einzelsträngige DNA zurückzuführen - sei es, daß diese noch Vektor-DNA enthält oder, daß sie noch chemische Verunreinigungen wie Phenol oder zuviel Salz enthält. Bei der Klonierung ist es von großem Vorteil eine gute Restriktionskarte der interessierenden DNA-Region in Händen zu haben. Damit kann man

gezielt auch von der Methode des 'forcierten Klonierens' (19) Gebrauch machen, bei der von zwei verschiedenen Restriktionsenden begrenzte Fragmente in M13-Vektoren mit unterschiedlich orientierter Inserierungsregion eingebaut werden. Dies erlaubt die direkte Sequenzierung beider DNA-Stränge. Die eleganteste Methode zur Schließung noch vorhandener Lücken in einer DNA-Sequenz ist die gezielte Verwendung von spezifischen 'Primern'. Die manuelle chemische Synthese von Oligodesoxynukleotiden, welche als 'Primer' eingesetzt werden können, ist allerdings technisch recht aufwendig und auch mit erheblichen Kosten verbunden. Die von uns benutzten 'Primer' von meist 14 Basen Länge ergaben häufig keine auswertbaren Gelbilder. Dies war möglicherweise auf die Bindung des jeweiligen 'Primers' an unspezifische Sequenzen oder auf dessen teilweise Selbstpaarung zurückzuführen. Andere Laboratorien haben mit dem Einsatz von selbsthergestellten 'Primern' ähnliche Erfahrungen gemacht (96), so daß die angesprochenen Schwierigkeiten zumindest zum Teil in der Natur der Sache liegen.

An dieser Stelle kann vielleicht auch kurz auf das von uns verwendete Sequenziergel-System eingegangen werden. Die von uns verwendete Apparatur (66, 97) mit thermostatisierbarer Platte hat den Vorteil, daß der sog. 'Smiling'-Effekt bei der Elektrophorese, d.h. das langsamere Laufen der Proben an den Außenseiten des Gels durch ungleichmäßige Temperaturverteilung, vermieden wird. Weiterhin war es durch Verwendung ultradünner Gele (0.1 mm) möglich, diese auf der Glasplatte direkt zu fixieren, dort zu trocknen und zu autoradiographieren. Dieses erleichtert einerseits die Handhabung der Gele außerordentlich und ergibt auf der anderen Seite im Autoradiogramm klare und scharfe Banden.

Zu Beginn des Ergebnis-Teils war der Ausdruck klonierter FAS DNA in *E. coli* untersucht worden (vgl. S.36). Dabei war nur im Extrakt der beiden FAS2 DNA-haltigen Klone mit Fettsäuresynthetase-Antikörpern spezifisch kreuzreagierendes Material (CRM) nachgewiesen worden. Allerdings waren diese von Antikörpern erkannten Proteine deutlich kleiner als die authentische FAS alpha-Untereinheit. Dies läßt sich entweder durch die Synthese eines verkürzten FAS-analogen Produkts in *E. coli* oder durch teilweisen Abbau einer vorher komplett synthetisierten alpha-Untereinheit erklären. Im Klon pMS 3021, der das vollständige FAS1 Gen enthält, wurde überhaupt kein FAS-spezifisches CRM gefunden. Für beide FAS-Untereinheiten gilt demnach, daß sie alleine ohne die Möglichkeit der Komplexbildung mit der anderen Untereinheit instabil sind und insbesondere in *E. coli* Zellen proteolytisch ganz (beta) oder zumindest teilweise (alpha) abgebaut werden. Diese Situation entspricht derjenigen in manchen Hefemutanten, in denen, obwohl nur eines der beiden FAS Gene defekt ist, überhaupt kein FAS-spezifisches kreuzreagierendes Material mehr zu entdecken ist (98). Um zu überprüfen, ob bei gleichzeitiger Synthese beider FAS-Untereinheiten in *E. coli* diese stabil und in authentischer Größe in der Procaryoten-Zelle vorliegen, soll nun ein Plasmid mit beiden FAS Genen konstruiert und seine Expression in *E. coli* untersucht werden. Auch soll ein *E. coli* Stamm als Wirt für FAS DNA-haltige Plasmide benutzt werden, welcher eine reduzierte Protease-Aktivität besitzt (99). Es ist allerdings möglich, daß andere Faktoren, wie das Fehlen bestimmter, auch in Procaryoten erkennbarer Promotor-Sequenzen, die Translation des nicht in einem Expressionsvektor klonierten FAS1 Gens verhindern. Falls das der Fall sein sollte, könnte man dies durch Umklonierung der FAS DNA in einen anderen, speziell für die Expression klonierter DNA konstruierten Vektor umgehen.

Auch der Arbeitsgruppe von S. Wakil in Houston ist es gelungen, aus zwei verschiedenen Hefe-DNA Genbanken *FAS1* und *FAS2* DNA-haltige *E. coli* Klone zu isolieren (100). Mit der einen Genbank, welche Hefe-DNA in den Vektor YEp13 eingebaut enthielt, transformierten sie je eine *fas1* und eine *fas2* Hefemutante. So erhielten sie die Plasmide YEpFAS1 und YEpFAS2. In der anderen Genbank (23), welche Hefe-DNA in einen *ColEI* Vektor inseriert enthielt, wurden mit FAS-spezifischen Antiseren die zwei Klone 33F1 (*FAS1*) und 102B5 (*FAS2*) identifiziert.

Vergleicht man die Restriktionskarten der Klone 33F1 und YEpFAS1 (Abb.55) mit der von pMS 3021 (Abb.54a u. b), so sieht man, daß die von uns klonierte DNA der *FAS1* Region (17 kb) auf beiden Seiten über die in den Wakil'schen Klonen enthaltene DNA (5.3 kb) hinausreicht. Die Restriktionskarten stimmen überein, mit dem Unterschied, daß bei den Wakil'schen Klonen auf der linken Seite ein 0.23 kb *HindIII* Fragment fehlt und daher die *FAS1* DNA lediglich bis zu dieser *HindIII* Schnittstelle kontinuierliche chromosomale Hefe-DNA enthält. Bei der *FAS2* Region ergibt sich bei Wakil durch Überlappung der beiden Klone 102B5 und YEpFAS2 ein klonierter DNA-Bereich von insgesamt 18 kb (Abb.56) verglichen mit einem insgesamt 23 kb langen DNA-Bereich in unseren *FAS2* Klonen (vgl. Abb.19). Die *FAS2* Restriktionskarten beider Laboratorien stimmen überein.

Die texanische Arbeitsgruppe hat versucht, die von ihnen klonierte *FAS* DNA in *E. coli* Maxizellen zur Expression zu bringen. Dabei konnten in den *FAS1* DNA-haltigen Klonen keine Translationsprodukte nachgewiesen werden, während in den *FAS2* Klonen immunologisch nachweisbares CRM mit einer maximalen Größe von etwa 160 000 Daltons synthetisiert wurde (100). Dieses Ergebnis ist qualitativ in Einklang mit entsprechenden Befunden an den von uns isolierten *FAS*-Klonen (s. oben und S.36).

Mit tierischer Fettsäuresynthetase (Huhn) wurde in der Wakil'schen Arbeitsgruppe versucht, die Reihenfolge der verschiedenen funktionellen Domänen durch partielle Spaltung des Enzyms mit verschiedenen spezifischen Proteasen festzustellen (101). Als Resultat dieser Experimente wurde ein Modell des Zusammenwirkens der beiden Huhn *FAS*-Untereinheiten bei der Synthese von Fettsäuren aufgestellt (Abb.57). Dabei wird eine Kopf-Schwanz Anordnung der beiden Untereinheiten und der gleichzeitige Ablauf zweier unabhängiger Fettsäuresynthese Zyklen im Dimeren angenommen.

Als Vergleich dazu ist das von Schweizer (102) aufgestellte Modell der Hefe-Fettsäuresynthese gezeigt, welches ebenfalls von einer Kopf-Schwanz Anordnung zweier jeweils identischer Untereinheiten (α oder β) im Komplex ausgeht. In Abb.58 ist die hypothetische minimale funktionelle Untereinheit $\alpha_2\beta_2$ der Hefe-FAS dargestellt. Die Reihenfolge der Domänen in der α Kette ist zur Zeit noch ungeklärt. Wie aus den Anordnungen der verschiedenen funktionellen *FAS*-Domänen in Abb.57 und Abb.58 ersichtlich ist, läßt sich die Entstehung der einzigen Untereinheit des tierischen Fettsäuresynthetase-Enzyms nicht durch eine einfache Verschmelzung der beiden Hefe-FAS Untereinheiten erklären. Geht man bei der Entstehung multifunktionaler Proteinketten von der Fusion ursprünglich einzelner Enzyme aus, so muß man entweder eine unabhängige Entstehung der *FAS*-Untereinheiten von Huhn und Hefe fordern oder zusätzlich zur ursprünglichen Genfusion noch nachträgliche DNA-Umorganisationsvorgänge bei der Evolution der Hefe-FAS zur Wirbeltier-FAS annehmen.

Durch Sequenz-Vergleich der *FAS* Gene aus *S. cerevisiae* und anderer Organismen können unter Umständen Aufschlüsse zu dieser Frage ebenso wie zu der Unabdingbarkeit bestimmter Domänen-Reihenfolgen im Gen für den Reaktionsablauf erwartet werden.

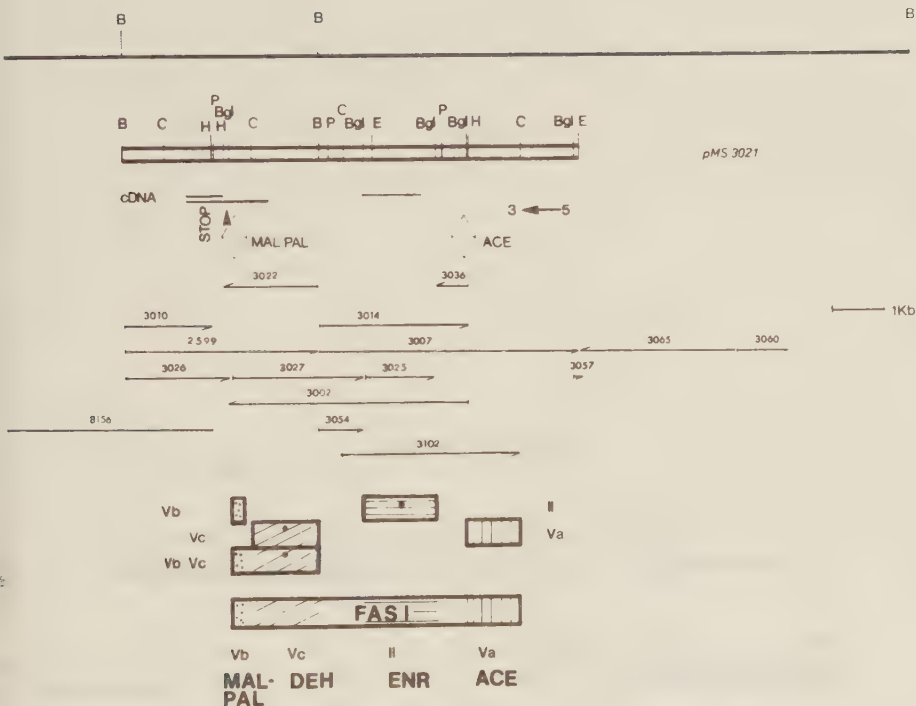


Abb.54: Lage der verschiedenen funktionellen Domänen im *FAS1* Gen (Darstellung nach M. Schweizer)

In (a) ist der gesamte durchgehend klonierte Bereich der *FAS1* DNA-Region mit den *Bam*HI-Schnittstellen (B) dargestellt.

(b) zeigt die Restriktionskarte von pMS 3021 mit den *Bam*HI (B), *Cla*I (C), *Hind*III (H), *Pvu*II (P), *Bgl*II (Bgl) und *Eco*RI (E) Schnittstellen. Ebenso sind Lage und Größe dreier *FAS1* cDNA Klone, die Transkriptionsrichtung der *FAS1* mRNA und die durch DNA-Sequenzierung lokalisierten aktiven Zentren der Acetyl-Transferase (ACE) und der Malonyl/Palmityl-Transferase (MAL-PAL) Domänen ebenso wie das Translations-Stoppcodon (STOP) angegeben.

In (c) sind Lage und Orientierung der wichtigsten zur Hefetransformation verwendeten *FAS1* Subklone wiedergegeben.

Die Ergebnisse der Transformationsdaten sind in (d) dargestellt: es sind die Bereiche der verschiedenen Komplementationsgruppen angegeben, die sich aus den Transformationsexperimenten mit subklonierter *FAS1* DNA ergeben. Im unteren Teil der Abbildung ist die daraus resultierende Anordnung der verschiedenen funktionellen Domänen gezeigt.

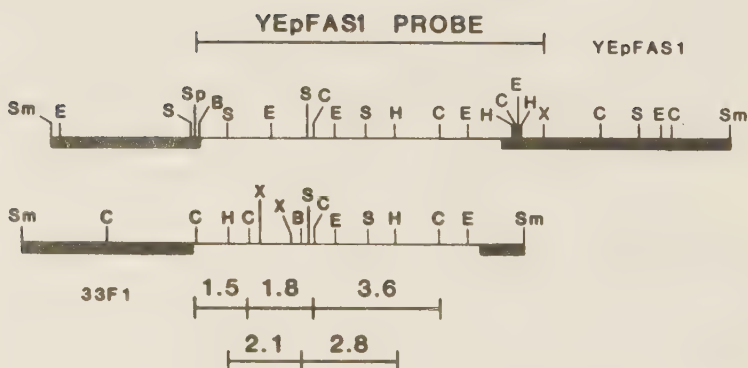


Abb.55: Restriktionskarte der Klone
YEpFAS1 (Herkunft S. Wakil)
und 33F1 (Herkunft J. Carbon)

Es ist die Lage der Restriktionsschnittstellen *Sma* (Sm), *Eco*RI (E), *Sal*I (S), *Sph*I (Sp), *Bam*HI (B), *Cla*I (C), *Hind*III (H) und *Xba*I (X) angegeben.

Die dicken Linien stellen Vektor-DNA (YEpl3 bei YEpFAS1 bzw. ColE1 bei 33F1) dar, die dünnen Linien klonierte Hefe-DNA.

Die Größen von drei *Cla*I und von zwei *Bam*HI/*Hind*III Fragmenten sind unter den Restriktionskarten gezeigt.

Vgl. Abb.15 und Abb.54.

Die Zeichnung ist (100) entnommen.

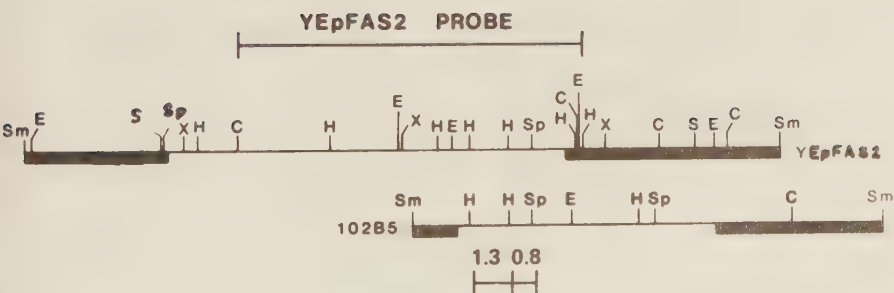


Abb.56: Restriktionskarte der Klone
YEpfAS2 (Herkunft S. Wakil)
und 102B5 (Herkunft J. Carbon)

Die Abkürzungen sind dieselben wie in Abb.55.
 Der Vektor bei YEpfAS2 ist YEpl3 und bei 102B5 ColE1.
 Die Größe eines HindIII und eines HindIII/SphI
 Fragmentes ist angegeben.
 Vgl. Abb.19.
 Die Zeichnung ist (100) entnommen.

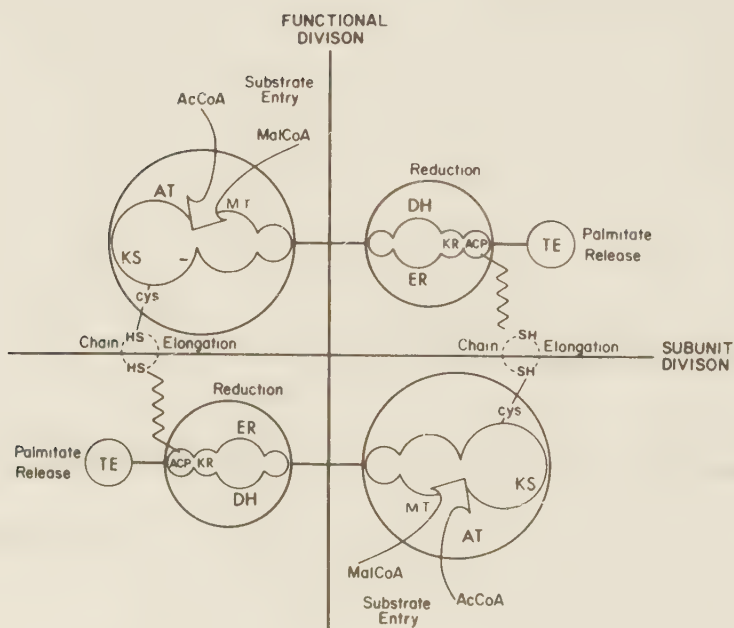


Abb.57: Funktionelles Modell der Huhn Fettsäuresynthetase
(nach Wakil, 101)

Das Modell beruht auf proteolytischen Experimenten von Wakil et al. (101). Zwei Untereinheiten in Kopf-Schwanz Anordnung (subunit division) und zwei Zentren der Fettsäuresynthese (functional division) sind mit den verschiedenen funktionellen Domänen dargestellt.

AT: Acetyl-Transferase, MT: Malonyl-Transferase, KS: beta-Ketoacylsynthetase, KR: beta-Ketoacylreduktase, DH: Dehydratase, ER: Enoylreduktase, TE: Thioesterase, ACP: Acyl Carrier Protein. Die Wellenlinie symbolisiert den 4'-Phosphopantethein Arm.

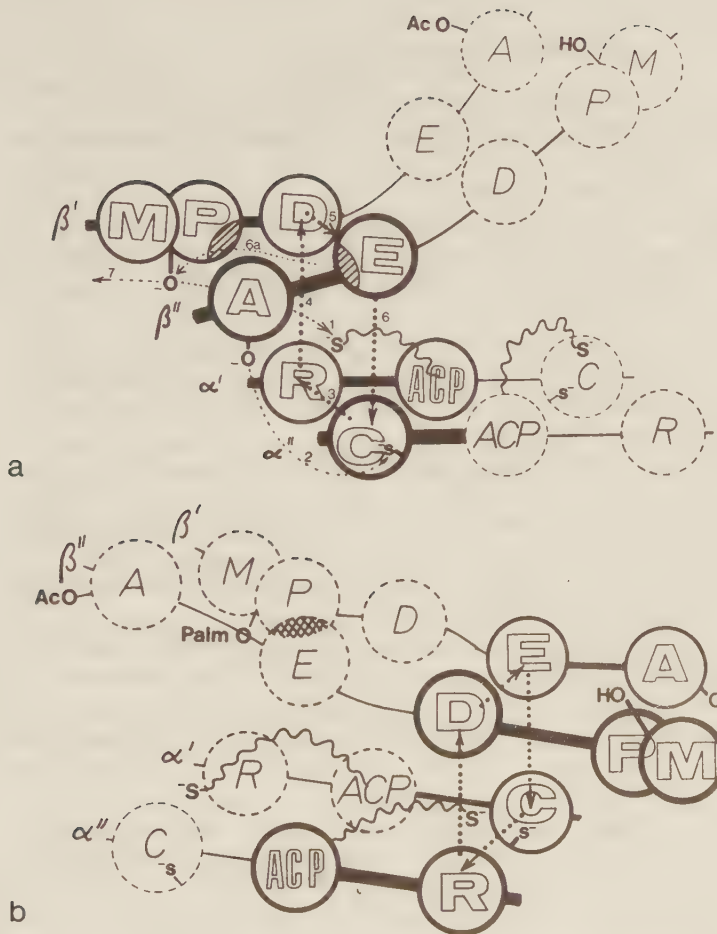


Abb.58: Funktionelles Modell der Hefe-Fettsäuresynthetase

Es ist ein funktioneller $\alpha_2\beta_2$ Minimalcomplex mit jeweiliger Kopf-Schwanz Anordnung der alpha und beta Untereinheiten und einem Zentrum der Fettsäuresynthese dargestellt.

A: Acetyl-Transferase, E: Enoylreduktase, D: Dehydratase,
P: Palmityl-Transferase, M: Malonyl-Transferase,
C: beta-Ketoacylsynthetase, R: beta-Ketoacylreduktase,
ACP: Acyl Carrier Protein. Die Wellenlinie symbolisiert den 4'-Phosphopantethein-Arm.

Die Zahlen zeigen die Reaktionsschritte an. Jeweils aktive katalytische Domänen sind mit dickem Strich gezeichnet, inaktive gestrichelt. Schattierte Bereiche in E und P treten möglicherweise in Gegenwart von Palmitat in hydrophobe Wechselwirkung.

In (a) ist die Fettsäure-Kettenverlängerung in einer Hälfte des $\alpha_2\beta_2$ Protomers gezeigt.

In (b) ist der Abbruch der Kettenverlängerung durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen E-gebundenem Palmitat und P dargestellt. Palmitat wird dabei auf die Bindungsstelle von P transferiert.

Durch Inaktivierung der linken Seite wird simultan die rechte Seite des FAS-Minimalcomplexes aktiviert.

Nach Schweizer aus (102).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es gewesen, die beiden klonierten Hefegene *FAS1* und *FAS2* sub- und umzuklonieren und mit Hilfe der subklonierten Teilbereiche die funktionelle Organisation und Sequenz zunächst von *FAS1* zu ermitteln. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Es wurde gezeigt, daß durch Ligation zweier unabhängig voneinander klonierter *FAS1* DNA *Bam*HI-Fragmente ein neues Plasmid (pMS 3021) entstanden war, welches 8.7 kb chromosomal zusammenhängender Hefe-DNA enthielt. Gleichzeitig wurde durch Versuche anderer Mitarbeiter nachgewiesen, daß pMS 3021 ein intaktes *FAS1* Gen enthält.

2. pMS 3021 sowie fünf *FAS1* bzw. *FAS2* DNA-haltige Cosmid-Klone wurden mit spezifischen Fettsäuresynthetase-Antikörpern immunologisch untersucht. Lediglich im *E. coli* Zellextrakt des *FAS2* Klons pYc 1156 konnte radioimmunologisch kreuzreagierendes Material nachgewiesen werden.

3. Die im Plasmid pMS 3021 klonierte *FAS1* DNA wurde mit insgesamt 15 verschiedenen Restriktionsendonukleasen physikalisch kartiert.

4. Durch Restriktionsanalyse und Southern-Hybridisierung wurden eine größere Anzahl, von anderen Mitarbeitern des Instituts hergestellter *FAS1* Subklone mit der bekannten *FAS1* Restriktionskarte korreliert (bzgl. Lage, Größe und Orientierung der subklonierten Fragmente im Vektor).

5. Die Transkriptionsregionen beider *FAS*-Gene wurden durch 'Northern'-Hybridisierung von Hefe poly(A) RNA mit definierten *FAS1* und *FAS2* DNA-Fragmenten bestimmt. Der Transkriptionsbereich von *FAS1* beträgt ca. 6 kb, der von *FAS2* ca. 8 kb.

6. Verschiedene *Pvu*II- und *Cla*I-Restriktionsfragmente von pMS 3021 wurden in den Vektoren pMS 201, pBC 351 und pCEN 11-3-1 (die zwei letztgenannten Vektoren enthalten ein Hefe-Centromer) subkloniert.

7. Durch Einbau eines *Sma*I-Adaptors in eine der beiden *Bam*HI-Schnittstellen von pMS 3021 wurde ein neben der inserierten Hefe-DNA linearisierbares *FAS1*-Plasmid hergestellt. Verschiedene daraus durch *Bal*31-Verdauung abgeleitete Deletionsplasmide wurden durch Restriktionsanalyse charakterisiert.

8. Die DNA's verschiedener *FAS1* und *FAS2* Hefetransformanten wurden durch Restriktions- und Southern-Hybridisierungsexperimente charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß mitotisch stabile Transformanten stets frei von Plasmid-DNA waren, während in mitotisch instabilen Transformanten die DNA des transformierenden Plasmids eindeutig nachweisbar war. Diese Plasmid-DNA lag entweder extrachromosomal oder chromosomal integriert oder in beiden Zuständen gleichzeitig in den Zellen vor.

9. Zur DNA-Sequenzbestimmung wurden definierte Restriktionsfragmente ebenso wie durch *Bal*31-Verdauung verkürzte Fragmente des *FAS1* DNA-haltigen Plasmids pMS 3021 in den M13 Vektoren mp8, mp10 oder mp11 subkloniert.

10. Es wurde an der Sequenzierung des *FAS1* Gens von *S. cerevisiae* mitgearbeitet. Hierbei wurden bisher neben einer Reihe kleinerer Teilsequenzen zwei große durchgehend sequenzierte Bereiche (1.6 und 4 kb) erhalten. Das 3' Ende des *FAS1* Gens wurde anhand einer Reihe nahe beieinander liegender Translations Stop-Codons am Ende eines 3.4 kb langen Leserahmens bestimmt. In diesem Leserahmen wurde die Malonyl/Palmityl-Transferase Domäne der beta-Untereinheit aufgrund der bekannten Aminosäuresequenz ihrer Substratbindungsstelle lokalisiert. In entsprechender Weise konnte in einer anderen Teilsequenz des *FAS1* Gens die Acetyl-Transferase Domäne identifiziert werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Volpe J.J. und Vagelos P.R. (1973) Annu. Rev. Biochem. 42, 21-60
2. Bloch K. und Vance D. (1977) Annu. Rev. Biochem. 46, 263-298
3. Majerus P.W., Alberts A.W., Vagelos P.R. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 1231-1238
4. Shimakata T. und Stumpf P.K. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 217, 144-154
5. Lynen F. (1969) Methods Enzymol. 14, 17-39
6. Schweizer E., Kniep B., Castorph H., Holzner U. (1973) Eur. J. Biochem. 39, 353-362
7. Stoops J.K., Arslanian M.J., Oh Y.H., Aune K.C., Vanaman T.C., Wakil S.J. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1940-1944
8. Schweizer M., Lebert C., Höltnke H.J., Roberts L.M., Schweizer E. (1984) Mol. Gen. Genet. 194, 457-465
9. Sakano H., Rogers J.H., Hüppi K., Heinrich B., Tonegawa S. (1979) Nature 277, 627-633
10. Breathnach R. und Chambon P. (1981) Annu. Rev. Biochem. 50, 349-383
11. Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.V., Heynecker H.L., Boyer H.W., Crosa J.H., Falkow S. (1977) Gene 2, 95-113
12. Bolivar F. (1978) Gene 4, 121-136
13. Soberon X., Covarrubias L. und Bolivar F. (1980) Gene 9, 287-305
14. Hohn B. und Collins J. (1980) Gene 11, 291-298
15. Kingsman A.J., Clarke L., Mortimer R.K., Carbon J. (1979) Gene 7, 141-152
16. Broach J.R., Strathern J.W. und Hicks J.B. (1979) Gene 8, 121-133
17. Beier D.R. und Young E.T. (1982) Nature 300, 724-728
18. Oertel W. und Mayer M. (1984) Mol. Gen. Genet. 195, 300-307
19. Messing J. (1983) Methods Enzymol. 101, 20-78
20. Hartwell L.H. (1967) J. Bacteriol. 93, 1662-1670
21. Borenstein C. und Warner J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1547-1551
22. Kühn L., Castorph H. und Schweizer E. (1972) Eur. J. Biochem. 24, 492-497
23. Clarke L. und Carbon J. (1978) J. Mol. Biol. 120, 517-532
24. Schwartz S.A. und Helinski D.R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6318-6327
25. Clark A.J., Maas W.K. und Low B. (1969) Mol. Gen. Genet. 105, 1-15
26. Kushner S.R. (1974) J. Bacteriol. 120, 1213-1218
27. Schweizer M., Case M.E., Dykstra C.C., Giles N.H., Kushner S.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5086-5090
28. Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M., Boyer H.W. (1977) Gene 2, 75-93
29. Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B., Hofschneider P.H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3642-3646
30. Whitaker J.R. und Granum P.E. (1980) Anal. Biochem. 109, 156-164
31. Itzhaki R.F. und Gill D.M. (1964) Anal. Biochem. 9, 401-407
32. Shapiro M. und Polisky B. (1979) Methods Enzymol. 68, 503-513
33. Birnboim H.C. und Doly J. (1979) Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523
34. Clewell D.B. (1972) J. Bacteriol. 110, 667-676

35. Produktinformation (1983) Pharmacia, Freiburg
36. Maniatis T., Fritsch E.F und Sambrook J. (1982) in: Molecular Cloning, a Laboratory Handbook; Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 93-94
37. D'Farrell P.H., Kutter E. und Nakanishi M. (1980) Mol. Gen. Genet. 179, 421-435
38. Kushner S.R. und Vapnek D. (1980) in: Media and Methods for Bacterial Genetics, Laboratory Manual; University of Georgia, Athens, 2-3
39. Swank R.W. und Munkres K.D. (1971) Anal. Biochem. 39, 462-467
40. Wieslander L. (1979) Anal. Biochem. 98, 305-309
41. Tautz D. und Renz M. (1983) Anal. Biochem. 132, 14-19
42. Vogelstein B. und Gillespie D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619
43. Produktinformation, American Flint Glass Corp., New York und Ref. 42
44. Tanaka T. und Weisblum B. (1975) J. Bacteriol. 121, 354-362
45. Pfeiffer B.H. und Zimmerman S.B. (1983) Nucl. Acids Res. 22, 7853-7874
46. Fuller F. (1982) Gene 19, 43-54
47. Kushner S.R. (1978) in: Genetic Engineering, Boyer H.W. und Nicosia S. (Eds.); Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, 17-25
48. Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237-251
49. Southern E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517
50. Smith G.E. und Summers M.D. (1980) Anal. Biochem. 109, 123-129
51. Horikawa S., Kamiryo T., Nakanishi S., Numa S. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 191-198
52. Aviv J. und Leder P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412
53. Raue N., Crkvenjakoo R. und Boedtkes H. (1979) Nucl. Acids Res. 6, 3559-3567
54. Wahl G.M., Stern M. und Stark G.R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687
55. Schleif R.F., Wensink P.C. (1981) Practical Methods in Molecular Biology, Springer, Berlin, 145-161
56. Denhardt D. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-652
57. Hutton J.A. (1977) Nucl. Acids Res. 4, 3537-3555
58. Zassenhaus H.P., Butow R.A. und Hannon Y.P. (1982) Anal. Biochem. 125, 125-137
59. Beggs J.D. (1978) Nature 275, 104-109
60. Bicknell J.N. und Douglas H.C. (1970) J. Bacteriol. 101, 505-512
61. Grunstein M. und Wallis J. (1979) Methods Enzymol. 68, 379-389
62. Hanahan D. und Meselson M. (1980) Gene 10, 63-71
63. Sanger F., Coulson A.R., Barrell B.G., Smith A.J.H., Roe B.A. (1980) J. Mol. Biol. 143, 161-178
64. Messing J., Crea R. und Seeburg P.H. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 309-321
65. Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
66. Garoff H. und Ansoerge W. (1981) Anal. Biochem. 115, 450-457
67. Duckworth M.L., Gait M.J., Goelet P., Hong G.F., Singh M., Titmas R.C. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 1691-1706
68. Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354
69. Erlich H.A., Cohen S.N. und McDavitt H.D. (1979) Methods Enzymol. 68, 443-453

70. Greenwood F.C., Hunter W.M und Glover J.S. (1963) *Biochem. J.* 89, 114-119
71. Hunter W.M. (1978) in: *Handbook of Experimental Immunology* 1, Weir D.M. (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 141-156
72. Lebert C. (1984) Dissertation, Universität Erlangen
73. Schweizer M., Höltke H.J., Lebert C., Roberts L.M. (1982) Abstract 11th International Conference on Yeast Genetics, 99
74. Minter S. und Sealey P. (1982) in: *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*, Rickwood D. und Hames B.D. (Eds.), IRL Press, Oxford, 227-232
75. Rosbash M., Harris P.K.W., Woolford J.M., Teem J.L. (1981) *Cell* 24, 679-686
76. Leer R.J., van Raamsdonk-Duin M.M.C., Molenaar C.M.Th., Cohen L.H., Mager W.H., Planta R. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10, 5869-5878
77. Teem J.L., Rodriguez J.R., Tung L., Rosbash M. (1983) *Mol. Gen. Genet.* 192, 101-103
78. Messing J. und Vieira J. (1982) *Gene* 19, 269-276
79. Favaloro J., Treisman R. und Kamen R. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 718-749
80. Caruthers M.H. (1982) in: *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments*, a Laboratory Manual, Gassen H.G. und Lang A. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 71-79
81. Engeser H., Hübner K, Straub J., Lynen F. (1979) *Eur. J. Biochem.* 101, 413-422
82. Bennetzen J.L. und Hall B.D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3018-3025
83. Holland J.P. und Holland M.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9839-9845
84. Ammerer G., Hitzeman R., Hagie F., Barta A., Hall B.D. (1981) in: *Recombinant DNA*, Walton A.G. (Ed.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 185-197
85. Langford C.J., Klinz F.J., Donath C, Gallwitz D. (1984) *Cell* 36, 645-653
86. Schweizer E., Werkmeister K. und Jain M.K. (1978) *Mol. Cell. Biochem.* 21, 95-106
87. Stoops J.K., Arslanian M.J., Chalmers J.H., Joshi V.C., Wakil S.J. (1977) *Bioorg. Chem.* 1, 339-370
88. Goldberg M. (1979) PhD Thesis, Stanford University, USA und Ref. 10, 369 ff.
89. Zaret K.S. und Sherman F. (1982) *Cell* 28, 563-573
90. Gallwitz D., Purin F. und Seidel R. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 6339-6350
91. Astell C.R., Ahlstrom-Jonasson L., Smith M., Tatchell K., Nasmyth K.A., Hall B.D. (1981) *Cell* 27, 15-23
92. Bennetzen J.L. und Hall B.D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3026-3031
93. Wieland F., (1978) Dissertation, Universität München, 64
94. Maxam A.M. und Gilbert W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564
95. Maxam A.M. und Gilbert W. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 499-560
96. Smith M, British Columbia Univ., Canada, persönliche Mitteilung
97. Produktinformation, Macrophor-System, LKB, München
98. Schuh B. (1984) Dissertation, Universität Erlangen
99. Bukhari A.I. und Zipser D. (1973) *Nature* 243, 238-241
100. Kuziora M.A., Chalmers J.H., Douglas M.S., Hitzeman R.A., Mattick J.S., Wakil S.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11648-11653

101. Tsukamoto Y., Wong H., Mattick J.S., Wakil S.J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 15312-15322
102. Schweizer E. (1984) in: Fatty Acid Metabolism and Its Regulation, Numa S. (Ed.), Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, 59-83
103. Rose G.D. und Roy S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4643-4647
104. Dobson M.J., Tuite M.F., Roberts N.A., Kingsman A.J., Kingsman S.M., Perkins R.E., Conroy S.C., Dunbar B., Fothergill L.A. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 2625-2637
105. Holland J.P. und Holland M.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2596-2605
106. Benoist C., O'Hare K., Breathnach R., Chambon P. (1980) Nucl. Acids. Res. 8, 127-142
107. Holland M.J., Holland J.P., Thill G.P., Jackson K.A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1385-1395
108. Wallis J.W., Hereford L. und Grundstein M. (1980) Cell 22, 799-805
109. Tschumper G. und Carbon J. (1980) Gene 10, 157-166
110. Dierks P., VanDoyen A., Mantei N., Weissmann C. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1411-1415
111. Zalkin H. und Yanofsky C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1491-1500
112. Zaret K.S. und Sherman F. (1982) Cell 28, 563-573

ABKÜRZUNGEN

A	Adenosinmonophosphat-Rest
A _x	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge (nm)
Abb.	Abbildung
ADH	Gen der Alkohol-Dehydrogenase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ARS	autonom replizierende Sequenz
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
C	Cytidinmonophosphat-Rest
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CEN	Centromer
Ci	Curie, Einheit für radioaktive Strahlung
cm	Centimeter
cpm	Counts (Impulse) pro Minute
CRM	kreuzreagierendes Material
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
D-Loop	Displacement-Loop (Verdrängungs-Schleife)
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Athylendiamintetraacetat
EEO	Elektroendoosmose
EtBr	Ethidium Bromid
FAS	Fettsäuresynthetase
FAS	Gen der Fettsäuresynthetase
fas	Fettsäure-auxotrophe Mutanten
ff.	und folgende
g	Gramm
G	Guanosinmonophosphat-Rest
GDH	Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde(n)
kb	Kilobasenpaar(e) (DNA) bzw. Kilobasen (RNA)
l	Liter
LEU2	Gen der beta-Isopropylmalat-Dehydrogenase in Hefe
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol(e)
mol	Mol(e)
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nmole	Nanomol(e)
Nr.	Nummer
o.	oben
PEG	Polyäthylenglykol
pMS	Plasmid Michael Schweizer
pYc	Plasmid Yeast Cosmid

RNA	Ribonukleinsäure
<i>rna</i>	Hefemutante(n) mit Defekten in der Synthese von mRNA's speziell ribosomaler Proteine
s.	siehe
S.	Seite
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
T	Thyminmonophosphat-Rest
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
<i>TRP1</i>	Gen der Phosphoribosyl-Anthranilat Isomerase in Hefe
u.	unten
U	Einheit der Enzymaktivität
U	Uridinmonophosphat-Rest
UAS	Upstream Activating Sites
UV	Ultraviolett
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
W	Watt
x g	-fache Erdbeschleunigung
#	Nummer

LEBENS LAUF

Ich wurde am 5. März 1953 in Fürth/Bayern geboren. Meine Mutter ist die Oberstudienrätin Irmgard Höltké.

- | | |
|----------------------------|--|
| 1959-1962 | Besuch der Grundschule in Nürnberg |
| 1962-1963 | Besuch der Grundschule in Windsbach |
| 1963-1969 | Besuch des humanistischen Joh. Seb. Bach-Gymnasiums in Windsbach |
| 1969-1970 und
1972-1974 | Besuch des humanistischen Melanchthon-Gymnasiums in Nürnberg |
| 22. Juni 1974 | Abitur |
| 1974-1975 | zwei Semester Studium der Informatik an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen |
| 1975-1981 | Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen |
| 20. März 1978 | Diplom-Vorprüfung |
| 23. Mai 1980 | Diplom-Hauptprüfung |
| Juni 1980-
Sept. 1981 | Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer |
| Okt. 1981-
Okt. 1984 | Anfertigung der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer |

Seit August 1981 bin ich mit Gabriele Dorn verheiratet.

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen